

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE  
FARMACEUTICKÁ FAKULTA V HRADCI KRÁLOVÉ  
KATEDRA FARMACEUTICKÉ BOTANIKY A EKOLOGIE

---

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Alkaloidy čeledi Amaryllidaceae a jejich biologická aktivita

Alkaloids of family Amaryllidaceae and their biological activity

Vedoucí katedry: doc. Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.

Vedoucí diplomové práce: doc. Ing. Lucie Cahlíková, Ph.D.

Hradec Králové, 2016

Lucie Gábrlová

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

v Hradci Králové, 16. 5. 2016

.....

podpis

Děkuji doc. Ing. Lucii Cahlíkové, Ph.D. za ochotu, vřelý přístup, pomoc, rady a poskytnuté materiály k vypracování mé diplomové práce. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Ivo Doskočilovi, Mgr. Martině Hrabínové a prof. RNDr. Lubomíru Opletalovi, CSc. za změření biologických aktivit izolovaných alkaloidů a doc. PharmDr. Jiřímu Kunešovi, Ph.D. a Mgr. Zdeňku Novákovi, Ph.D. za změření a interpretaci NMR spekter. Děkuji také celému kolektivu Katedry farmaceutické botaniky a ekologie, Farmaceutické fakulty v Hradci Králové za příjemné pracovní prostředí a pomoc při měření.

Tato práce byla podpořena projektem SVV 260 292.

# Obsah

1	ÚVOD .....	5
2	CÍL PRÁCE .....	7
3	TEORETICKÁ ČÁST .....	8
3.1	ČELEĎ AMARYLLIDACEAE .....	8
3.1.1	Obecná charakteristika .....	8
3.1.2	<i>Chlidanthus fragrans</i> .....	8
3.1.2.1	Taxonomické zařazení .....	8
3.1.2.2	Charakteristika .....	9
3.2	ALKALOIDY ČELEDI AMARYLLIDACEAE .....	10
3.2.1	Obecná charakteristika .....	10
3.2.2	Biosyntéza .....	11
3.2.3	Strukturní typy .....	14
3.2.3.1	Alkaloidy lykorinového typu .....	14
3.2.3.2	Alkaloidy homolykorinového typu .....	14
3.2.3.3	Alkaloidy krininového a haemanthaminového typu .....	15
3.2.3.4	Alkaloidy tazettinového typu .....	16
3.2.3.5	Alkaloidy narciklasinového typu .....	17
3.2.3.6	Alkaloidy montaninového typu .....	18
3.2.3.7	Alkaloidy galanthaminového typu .....	18
3.3	BIOLOGICKÁ AKTIVITA AMARYLKOVITÝCH ALKALOIDŮ .....	20
3.3.1	Protinádorová aktivita .....	20
3.3.1.1	Lykorinový strukturní typ .....	21
3.3.1.2	Narciklasinový strukturní typ .....	22
3.3.1.3	Haemanthaminový a krininový strukturní typ .....	23
3.3.1.4	Tazettinový strukturní typ .....	25
3.3.2	Anticholinergní aktivita .....	26
3.3.2.1	Alzheimerova choroba .....	26
3.3.2.2	Galanthaminový strukturní typ .....	29
3.3.2.3	Lykorinový strukturní typ .....	32
3.3.2.4	Krininový a haemanthaminový strukturní typ .....	33
3.3.3	Antibakteriální aktivita .....	34
3.3.4	Antiplasmodiální aktivita .....	35
3.3.5	Antiparazitická aktivita .....	36
3.3.6	Další aktivity .....	36
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....	38
4.1	POUŽITÉ METODY .....	38
4.1.1	Destilace .....	38
4.1.2	Tenkovrstvá chromatografie .....	38
4.1.3	Promývání .....	38
4.1.4	Odpařování .....	38
4.2	POUŽITÝ MATERIÁL .....	38
4.2.1	Rozpouštědla .....	38
4.2.2	Chemikálie .....	39
4.2.3	Vyvíjecí soustavy pro TLC .....	39
4.2.4	Adsorbenty pro TLC .....	39
4.3	IZOLACE ALKALOIDŮ .....	39
4.3.1	Biologický materiál .....	39

4.3.2	Příprava alkaloidního extraktu .....	39
4.3.3	Frakce použitá pro izolaci alkaloidů.....	40
4.3.4	Preparativní tenkovrstvá chromatografie .....	40
4.3.4.1	Příprava desky .....	40
4.3.4.2	Výběr vhodné vyvíjecí soustavy pro preparativní TLC .....	40
4.3.4.3	Dělení alkaloidního extraktu.....	40
4.3.5	Strukturní analýza izolovaných alkaloidů .....	42
4.3.5.1	EI-MS analýza .....	42
4.3.5.2	NMR analýza .....	42
4.3.6	Stanovení inhibiční aktivity izolovaných alkaloidů vůči erytrocytární AChE a sérové BuChE .....	42
4.3.7	Stanovení inhibiční aktivity izolovaných alkaloidů vůči POP .....	43
4.3.8	Stanovení cytotoxické aktivity izolovaných alkaloidů.....	43
5	VÝSLEDKY .....	44
5.1	STRUKTURNÍ ANALÝZA 6A-HYDROXYBUFANIDRINU .....	44
5.1.1	EI-MS analýza .....	44
5.1.2	NMR analýza.....	44
5.1.2.1	Popis <sup>1</sup> H NMR spektra 6α-hydroxybufanidrinu .....	44
5.1.2.2	Popis <sup>13</sup> C NMR spektra 6α-hydroxybufanidrinu .....	45
5.2	STRUKTURNÍ ANALÝZA KRINAMIDINU .....	45
5.2.1	EI-MS analýza .....	45
5.2.2	NMR analýza.....	45
5.2.2.1	Popis <sup>1</sup> H NMR spektra krinamidinu .....	46
5.2.2.2	Popis <sup>13</sup> C NMR spektra krinamidinu .....	46
5.3	STRUKTURNÍ ANALÝZA KRININU .....	46
5.3.1	EI-MS analýza .....	46
5.3.2	NMR analýza.....	47
5.3.2.1	Popis <sup>1</sup> H NMR spektra krininu .....	47
5.3.2.2	Popis <sup>13</sup> C NMR spektra krininu .....	47
5.4	INHIBIČNÍ AKTIVITA IZOLOVANÝCH ALKALOIDŮ VŮČI ERYTROCYTÁRNÍ AChE A SÉROVÉ BUCHE.....	48
5.5	INHIBIČNÍ AKTIVITA IZOLOVANÝCH ALKALOIDŮ VŮČI POP .....	48
5.6	CYTOTOXICKÁ AKTIVITA IZOLOVANÝCH ALKALOIDŮ.....	49
6	DISKUSE A ZÁVĚR .....	50
7	POUŽITÁ LITERATURA .....	52
8	SEZNAM ZKRATEK .....	59

# 1 Úvod

Terapeutické účinky rostlin byly již od pradávna lidstvem využívány, zkoumány a popisovány. Existuje dokonce důkaz, že již neandrtálci před šedesáti tisíci lety používali některé rostliny jako léčivé a celá řada tehdy využívaných rostlin tvoří i dnes stále důležitou součást tradiční medicíny<sup>1</sup>.

O znalosti účinků rostlin můžeme v historii nalézt mnoho důkazů. Ještě před začátkem našeho letopočtu využíval rostliny k léčbě např. Hippokrates, který popsal něco okolo tří set rostlin. V prvním století našeho letopočtu pak byla sepsána *De Materia Medica*, tedy encyklopedie s léčivými rostlinami, jejímž autorem je Dioscorides. Toto dílo bylo používáno celou řadu let a následně se stalo i vzorem a výchozím materiálem pro moderní lékopisy. Důkazem, že rostliny v léčitelství mají své místo je nepochybně i fakt, že dokonce i v Bibli nalezneme zmínku o zhruba třiceti léčivých rostlinách<sup>1</sup>.

Potenciál rostlinných metabolitů samozřejmě nezůstává bez povšimnutí ani v dnešní době. Uvádí se, že za posledních dvacet let je až 61% nových aktivních molekul z přírodních zdrojů nebo jsou to alespoň látky přírodními produkty inspirovány. I přesto máme v přírodě stále obrovské množství molekul k prozkoumání. Více než polovina rostlinných druhů zatím nebyla fytochemicky zkoumána. U velké části z nich se můžeme opřít právě o tradiční medicínu, nicméně chybí zhodnocení podle současných kritérií<sup>2</sup>.

Látky, které nás v rostlinách zajímají, jsou sekundární metabolity. Ty byly dříve považovány pouze za odpadní produkty rostlin, nicméně dnes už se ví, že se jedná o látky vysoce biologicky aktivní a rostliny je syntetizují pro svoji ochranu, barvu nebo třeba vůni. Struktura sekundárních metabolitů je rozmanitá i přesto, že se všechny odvíjí jen od několika málo stavebních kamenů. Výsledkem jsou například terpeny, steroidy a také pro tuto práci důležité alkaloidy<sup>2</sup>. Jejich chemická struktura je velmi rozmanitá, je pro ně ale typická přítomnost bazického dusíku. Od toho je i odvozen jejich název, protože stejně jako alkalické sloučeniny v anorganické chemii reagují s kyselinami za vzniku solí. Podle základního skeletu, který ve své struktuře obsahují, pak jednotlivé alkaloidy dělíme do skupin (např. indolové, tropanové nebo pyrolidinové alkaloidy)<sup>3</sup>.

Alkaloidy čeledi Amaryllidaceae, kterým je tato práce věnována, přitahují pozornost vědců díky svým zajímavým farmakologickým účinkům. Mezi ně patří cytotoxicita, antivirová aktivita nebo inhibice acetylcholinesterasy (AChE)<sup>4</sup>. Prvním a prozatím také jediným alkaloidem této skupiny zavedeným v klinické praxi se stal galanthamin, který je využíván k symptomatické léčbě Alzheimerovy choroby (AD)<sup>15</sup>. Další alkaloidy jako

lykorin, haemanthamin nebo narciklasin jsou známy svojí protinádorovou aktivitou a potenciál k využití v medicíně bezpochyby mají, nicméně praktické uplatnění prozatím ne. Limitující je především nízká koncentrace těchto látek v rostlinách. Vědci se tedy nezabývají pouze vlastnostmi alkaloidů, ale důležitým úkolem je i nalezení způsobů, které by umožnily větší dostupnost těchto látek v kombinaci s přijatelnými ekonomickými podmínkami. K tomu by mohly sloužit vyšlechtěné druhy rostlin s vyšším obsahem alkaloidů nebo nové syntetické cesty k získání potřebných alkaloidů<sup>14,15</sup>.

## 2 Cíl práce

- 1) Zpracování přidělené frakce alkaloidního extraktu *Chlidanthus fragrans* pomocí tenkovrstvé chromatografie
- 2) Izolace alespoň dvou alkaloidů
- 3) Strukturní identifikace izolovaných látek s využitím fyzikálně chemických metod
- 4) Příprava izolovaných látek pro screening jejich biologických aktivit



## 3 Teoretická část

### 3.1 Čeleď Amaryllidaceae

#### 3.1.1 Obecná charakteristika

Čeleď Amaryllidaceae (Amarylkovité) představuje skupinu rostlin, která je rozšířená po mnoha zemích světa. Typické jsou tyto rostliny především pro tropické a subtropické oblasti Jižní Afriky a Jižní Ameriky a celá řada z nich je pěstována také jako okrasné květiny, nejen v těchto oblastech (např. *Amaryllis*, *Clivia*, *Narcissus*<sup>37</sup>). Důvodem jsou jednak jejich krásné květy a jednak produkce éterických olejů<sup>5</sup>. Čeleď zahrnuje 85 rodů a je v ní popsáno asi 1100 druhů, tyto údaje se ale mohou lišit původem zdroje<sup>6</sup>. Některé zástupce dokonce můžeme najít i v České republice. Konkrétně se jedná o narcisy (*Narcissus*), bledule (*Leucojum*) a sněženky (*Galanthus*)<sup>7</sup>.

Amarylkovité jsou vytrvalé cibulovité byliny. Jejich listy jsou čárkovité, přízemní, ale i lodyžní. Květy mají oboupohlavné, jednotlivé nebo ve šroubelovitých květenstvích. Plodem jsou tobolky nebo bobule<sup>2</sup>.

Pro čeleď je typická produkce specifických alkaloidů (alkaloidy čeledi Amaryllidaceae), díky kterým je v poslední době věnována amarylkovitým rostlinám velká pozornost. Jejich biologické účinky jsou ale známy už velmi dlouho a tyto rostliny byly a stále jsou důležitou součástí tradiční medicíny různých zemí. Použití *Narcissus poeticus* je datováno již do doby Hippokrata z Kósu, tedy zhruba do 4. století před Kristem. Odsud pochází zmínky o užívání olejového extraktu ze zmíněného narcisu k léčbě děložních nádorů. Během dalších let začaly být využívány a studovány i další rostliny z čeledi Amaryllidaceae. Postupně se zmínky o nich objevovaly i v Číně, Africe nebo v arabské medicíně<sup>5</sup>.

#### 3.1.2 *Chlidanthus fragrans*

##### 3.1.2.1 Taxonomické zařazení

Říše: *Plantae* (rostliny)

Podříše: *Tracheobionta* (cévnaté rostliny)

Oddělení: *Magnoliophyta* (krytosemenné)

Třída: *Liliopsida* (jednoděložné)

Řád: *Asparagales* (chřestotvaré)

Čeleď: *Amaryllidaceae* (amarylkovité)

Rod: *Chlidanthus*<sup>8</sup>

### 3.1.2.2 Charakteristika

*Chlidanthus fragrans* je zástupcem nepočetného rodu *Chlidanthus* z čeledi Amaryllidaceae, který se vyskytuje především v teplejších oblastech Jižní Ameriky. Domovem této rostliny jsou Peruánské Andy. Rostlina je zároveň pěstována jako okrasná, jednak pro svůj vzhled a jednak pro svou výraznou citrusovou vůni<sup>9</sup>. Listy jsou dlouhé, lineární, vyrůstající v přízemní růžici. Na koncích holých stonků pak stopkovitě přisedají světle žluté květy trubkovitého tvaru<sup>10</sup>.



Obrázek 1. *Chlidanthus fragrans*<sup>16</sup>

Z fytochemického hlediska se jedná o rostlinu prozatím méně prozkoumanou. Starší studie popsaly přítomnost pouze čtyř hlavních alkaloidů (galanthamin, chlidanthin, lykorin a tazettin). V roce 2011 pak byla publikována studie<sup>62</sup>, podle které je počet alkaloidů obsažených v této rostlině mnohem větší. Pro zkoumání byl použit ethanolový extrakt z cibulí *Chlidanthus fragrans*, u kterého testování biologické aktivity přineslo zajímavé výsledky. Alkaloidní frakce tohoto extraktu vykazovala slibnou aktivitu proti lidské erytrocytární acetylcholinesterase (HuAChE) i butyrylcholinesterase z lidské

plazmy (HuBuChE), kde byly následně stanoveny inhibiční koncentrace ( $IC_{50}$ ) – konkrétně  $20,1 \pm 2,9 \mu\text{g/ml}$  pro HuAChE a  $136,8 \pm 6,9 \mu\text{g/ml}$  pro HuBuChE. V další části byl extrakt podroben GC-MS analýze (plynová chromatografie spojená s hmotnostně spektrometrickou detekcí) a podařilo se v něm identifikovat patnáct alkaloidů z pěti různých strukturních skupin (galanthaminový, krininový, tazettinový, lykorinový a belladinový typ), kde v největším zastoupení byly alkaloidy tazettin, chlidanthin, belladin a lykorin. V další studii<sup>4</sup>, která vznikla o dva roky později, byla testována inhibiční aktivita jednotlivých alkaloidů vůči HuAChE, HuBuChE i POP (prolyl oligopeptidasa), kde se např. aktivita undulatinu ukazovala být poměrně zajímavou, především díky inhibici POP. Z obou studií je pak zřejmé, že *Chlidanthus fragrans* může být zdrojem účinných látek, díky kterým bude pravděpodobně i dále předmětem zkoumání<sup>4,62</sup>.

## 3.2 Alkaloidy čeledi Amaryllidaceae

### 3.2.1 Obecná charakteristika

Jak již bylo zmiňováno výše, alkaloidy rostlin čeledi Amaryllidaceae jsou v poslední době předmětem zájmu mnoha studií biologů i chemiků, kteří popisují poměrně široké spektrum biologických aktivit těchto látek, a také přinášejí nové a přesnější metody pro jejich izolaci, identifikaci a syntézu<sup>11,12</sup>.

Prvním izolovaným alkaloidem z této skupiny byl lykorin, který se roku 1877 podařilo izolovat z *Narcissus pseudonarcissus*. Následné studie ukázaly jeho vysokou biologickou aktivitu (protinádorová, protivirová, protizánětlivá), čímž byly odstartovány další výzkumy. Výsledkem následných intenzivních studií amaryllkovitých alkaloidů je v současnosti zhruba 500 izolovaných látek různých struktur se zajímavými účinky<sup>5,6</sup>. Izolaci a především identifikaci takto velkého počtu nových látek umožnil samozřejmě i vědecký posun v metodice. Dřívější analýzy klasickými fytochemickými metodami s využitím různých spektroskopických postupů rozeznávaly v každém druhu zhruba pět až deset sloučenin. Navíc nebylo ani možné přesněji určit procentuální zastoupení jednotlivých látek v daném extraktu. S příchodem GC-MS analýzy už jsou výsledky přesnější a ukazují, že složení extraktů je mnohem komplikovanější. Udává se, že každý druh může obsahovat až třicet alkaloidů, z nichž několik málo představuje dominantní alkaloidy a ostatní jsou zastoupeny jen v menším množství<sup>11,12</sup>. Tato metoda kombinuje

plynovou chromatografií s hmotnostním spektrometrem. Plynová chromatografie patří mezi analytické separační metody a má zásadní postavení v analýze těkavých látek. Výhodou kombinace s hmotnostním spektrometrem je možnost nejen detekce přítomnosti analytu, ale zároveň jeho identifikace podle hmotnostního spektra<sup>48</sup>. Kromě GC-MS se pro zpracování amarylkovitých alkaloidů používá i celá řada dalších metod, jako je chromatografie (tenkovrstvá i vysokoúčinná kapalinová chromatografie), spektrofotometrie, elektroforéza nebo polarimetrie, které kromě separace, kvalitativní a kvantitativní analýzy umožňují i detailnější popis získaných molekul (izomerie nebo optická otáčivost)<sup>11</sup>.

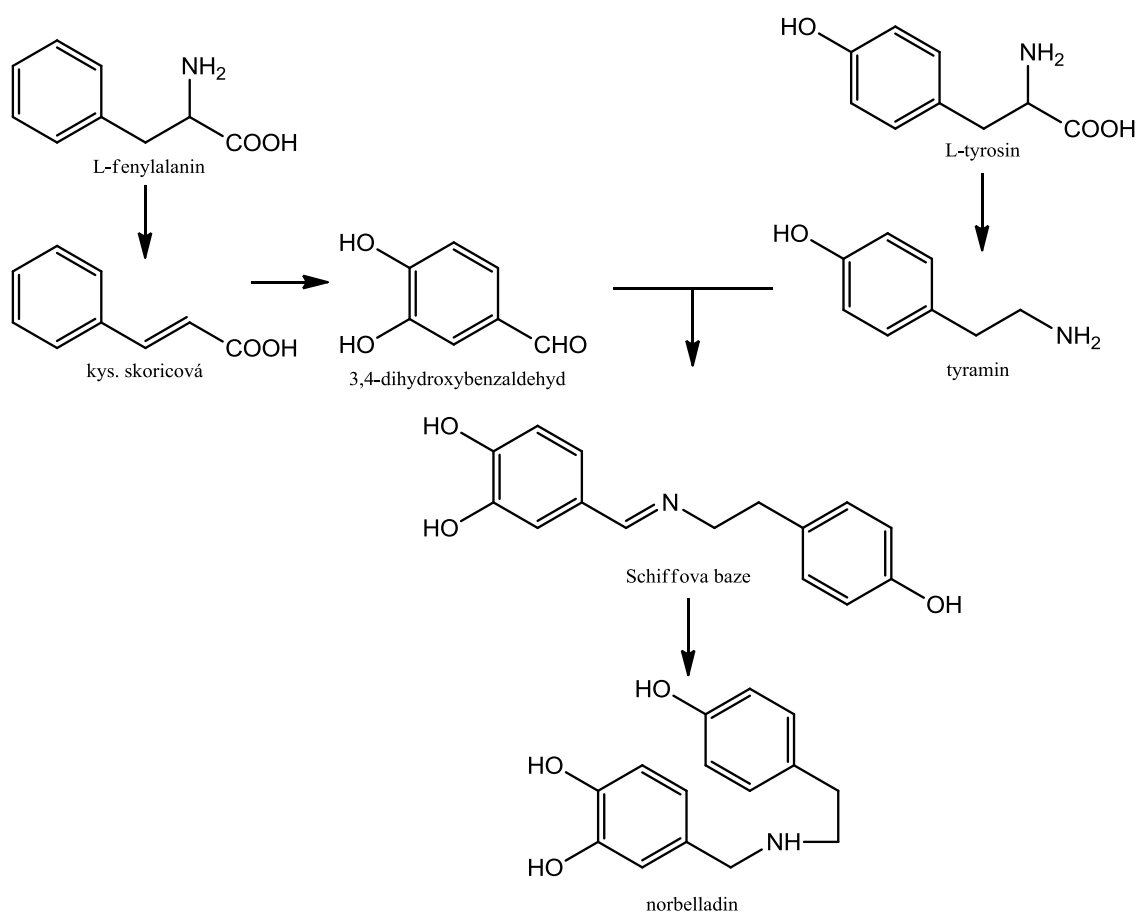
Po chemické stránce je pro tuto skupinu látek společným znakem tetracyklický základ s pěti- nebo šestičlenným kruhem, který obsahuje atom dusíku. Některé alkaloidy jsou navíc tvořeny dalším kruhem s (-O-CH<sub>2</sub>-O-) můstkem<sup>13</sup>. Základem pro amarylkovité alkaloidy jsou aminokyseliny fenylalanin a tyrosin, díky čemuž bývají formálně řazeny do skupiny isochinolinových alkaloidů. Vzhledem k tomu, že jejich výskyt je téměř výlučně vázán na čeleď Amaryllidaceae, často jsou namísto skupiny isochinolinových alkaloidů zařazovány do vlastní skupiny alkaloidů čeledi Amaryllidaceae. V rámci této skupiny jsou pak tříděny podle struktury do několika skupin strukturních typů. Zařazení do vlastní skupiny jistě nahrává i fakt, že svou zajímavostí dostaly celou čeleď Amaryllidaceae mezi dvacet nejdůležitějších alkaloidních čeledí světa<sup>6</sup>.

### 3.2.2 Biosyntéza

Biosyntéza amarylkovitých alkaloidů byla nejvíce zkoumána v padesátých a šedesátých letech a to biochemickými metodami s využitím radioaktivního značení. I přes to, že na výzkumech pracovala celá řada vědeckých skupin, na rozdíl od popisu biologických aktivit alkaloidů čeledi Amaryllidaceae jsou informace o jejich biosyntéze ne zcela kompletní. V současnosti je uznávána biosyntetická cesta přes meziprodukt norbelladin, nicméně nemůžeme úplně vyloučit, že v syntetických cestách jednotlivých alkaloidů jsou určité odchylky. Přítomnost různých enzymatických komplexů potom zajišťuje variabilitu vznikajících alkaloidů jak v rámci druhů, tak v různých částech stejné rostliny<sup>14,15,37</sup>.

Substráty pro syntézu vychází z primárního metabolismu rostliny. Konkrétně se zde jedná o aromatické aminokyseliny L-fenylalanin a L-tyrosin, jejichž chemická struktura je sice velmi podobná, v metabolismu jsou však navzájem nezastupitelné. V prvním

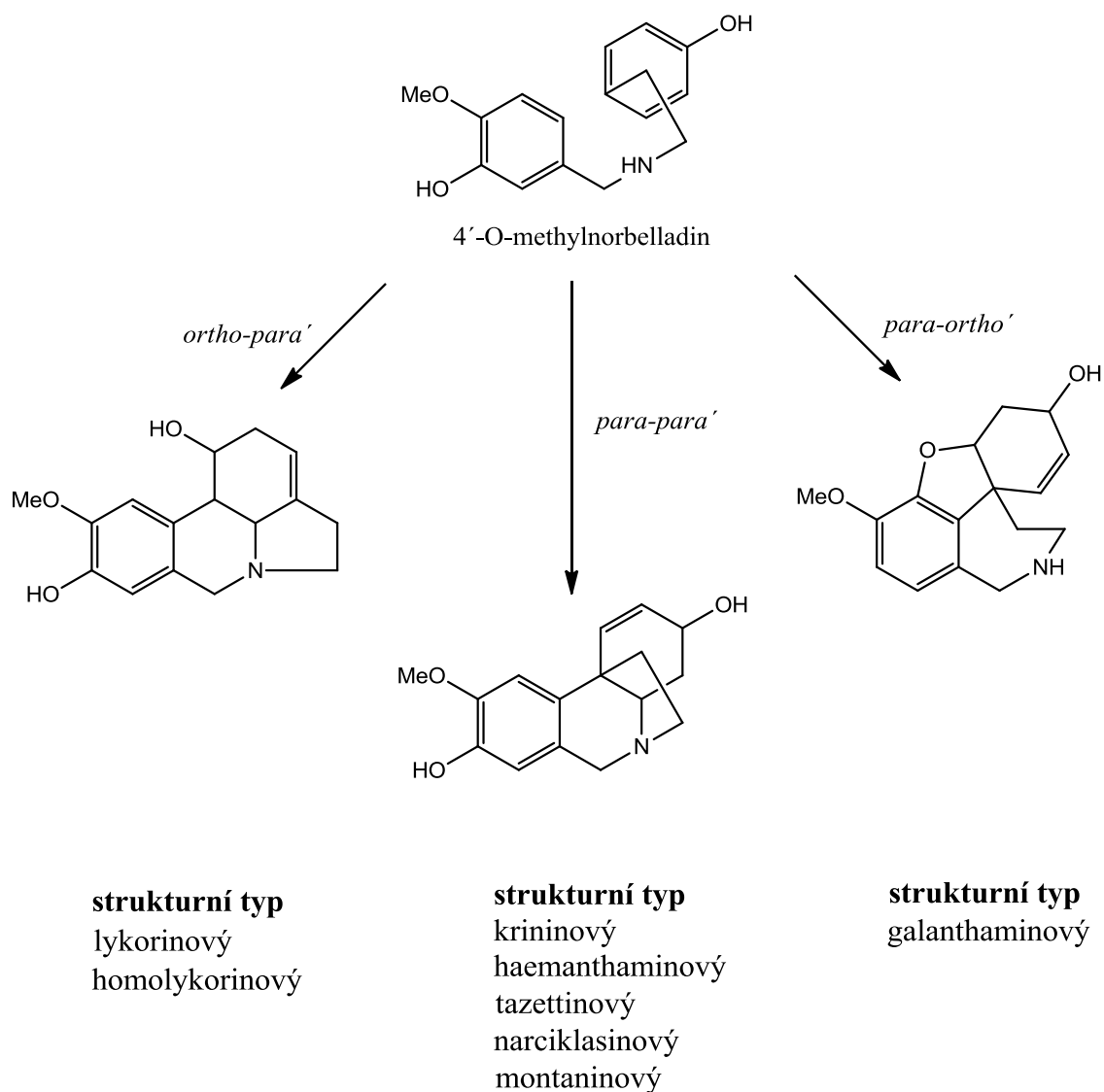
kroku je L-fenylalanin pomocí enzymu fenylalaninamoniaklyasa (PAL) přeměněn na amoniak a kyselinu skořicovou, ze které jsou následně dvěma hydroxylačními reakcemi odstraněny dva uhlíky za vzniku 3,4-dihydroxybenzaldehydu. L-tyrosin je pomocí tyrosindekarboxylasy přeměněn na tyramin. Ten následnou reakcí s 3,4-dihydroxybenzaldehydem vytvoří Schiffovu bazi, která se reduktasou přemění na norbelladin. Vzniklý norbelladin (případně pro stabilizaci methylovaný 4'-O-methylnorbelladin) je výchozím meziproduktem pro vznik různých struktur amarylkovitých alkaloidů<sup>14,15,17,37</sup>.



Obrázek 2. Biosyntéza norbelladinu

Dalším velmi důležitým krokem biosyntézy je oxidativní cyklizace 4'-O-methylnorbelladinu, která je katalyzována enzymy ze skupiny cytochromů P450. Tato cyklizace probíhá třemi různými způsoby (*ortho-para*, *para-para*, *para-ortho*) a dává tak vzniknout několika strukturním typům alkaloidů. Konkrétně se jedná

o lykorinový, homolykorinový, krininový, haemanthaminový, tazettinový, narciklasinový, montaninový a galanthaminový typ. Na jejich základních strukturách pak probíhají další reakce, jako jsou oxidace, redukce, hydroxylace, methylace, které umožní vznik dalších alkaloidů<sup>14,15,17</sup>.



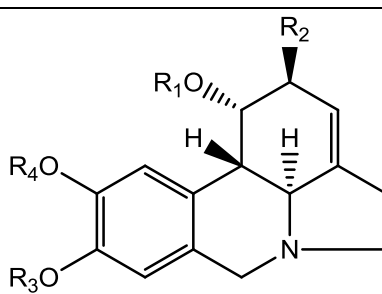
Obrázek 3. Cyklizace 4'-O-methylnorbelladinu

### 3.2.3 Strukturní typy

#### 3.2.3.1 Alkaloidy lykorinového typu

Alkaloidy tohoto typu jsou odvozeny od pyrollo[*de*]fenantridinu, který při cyklizaci norbelladinu vzniká způsobem *ortho-para*. Hlavním zástupcem této skupiny je lykorin, jehož strukturu popsal poprvé v roce 1956 Nagakawa<sup>18,19</sup>. Další představitelé jsou např. 1-*O*-acetyllykorin, pseudolykorin, galanthin, norpluviin, amarbellisin nebo lykoren<sup>20</sup>.

Tabulka 1. Alkaloidy lykorinového typu

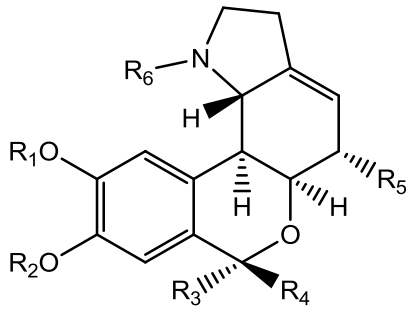
Alkaloid	Struktura			
				
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
lykorin	H	OH	-CH <sub>2</sub> -	-CH <sub>2</sub> -
pseudolykorin	H	OH	Me	H
1- <i>O</i> -acetyllykorin	Ac	OH	-CH <sub>2</sub> -	-CH <sub>2</sub> -
galanthin	H	OMe	Me	Me
norpluviin	H	H	Me	H
pluviin	H	H	Me	Me

Rostlinných zdrojů můžeme najít hned několik. Patří mezi ně zástupci rodů *Amموcharis*<sup>32</sup>, *Crinum*<sup>21</sup>, *Galanthus*, *Leucojum*<sup>22</sup>, *Lycoris*<sup>24</sup>, *Narcissus*<sup>22</sup> nebo *Zephyranthes*<sup>23</sup>.

#### 3.2.3.2 Alkaloidy homolykorinového typu

Tato skupina alkaloidů je strukturně odvozena od 2-benzopyrano[3,4-*g*]indolu a stejně jako alkaloidy lykorinového typu vzniká z norbelladinu cyklizací *ortho-para*<sup>18</sup>. Kromě nejvýznamnějšího zástupce homolykorinu sem řadíme i lykorenin, hippeastrin, odulin, masonin či neronin<sup>25</sup>.

Tabulka 2. Alkaloidy homolykorinového typu

Alkaloid	Struktura					
						
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>
homolykorin	Me	Me	O	O	H	Me
hippeastrin	-CH <sub>2</sub> -	-CH <sub>2</sub> -	O	O	OH	Me
lykorenin	Me	Me	OH	H	H	Me
odulin	-CH <sub>2</sub> -	-CH <sub>2</sub> -	OH	H	H	Me
masonin	-CH <sub>2</sub> -	-CH <sub>2</sub> -	O	O	H	Me

Mezi rody, ve kterých tyto zástupce můžeme najít, patří *Galanthus*<sup>26</sup>, *Crinum*<sup>27</sup>, *Narcissus*, *Leucojum*<sup>25</sup> nebo *Hippeastrum*<sup>28</sup>.

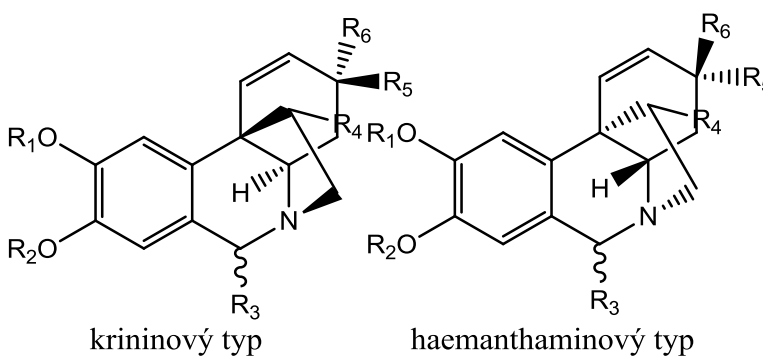
### 3.2.3.3 Alkaloidy krininového a haemanthaminového typu

Mezi alkaloidy vznikající oxidativní cyklizací *para-para* patří skupiny krininového a haemanthaminového typu, které vychází ze stejného strukturního základu, konkrétně z molekuly 5,10*b*-ethanofenantridinu<sup>18</sup>. Rozdílem je pouze konfigurace 5,10*b*-ethano můstku, která je navzájem opačná<sup>25</sup> (jsou tedy enantiomery<sup>31</sup>). Společně s lykorinovým typem alkaloidů potom představují nejhojněji se vyskytující skupiny amarylkovitých alkaloidů<sup>25</sup>. Jak už název skupiny napovídá, hlavní zástupci jsou zde krinin a haemanthamin. Jako další představitele pak můžeme jmenovat ambellin, buphanisin, bulbispermin, flexinin, haemanthidin, krinamin, krinamidin, powellin, undulatin nebo vitattin<sup>29</sup>.

Obě tyto skupiny amarylkovitých alkaloidů pak můžeme najít v rodech *Ammocharis*<sup>32</sup>, *Crinum*<sup>37,29</sup>, *Galanthus*<sup>30</sup>, *Hippeastrum*<sup>28,31</sup>, *Nerine*<sup>25</sup>, *Narcissus*<sup>37</sup>, *Lycoris*<sup>25</sup> či *Zephyranthes*<sup>23</sup>.



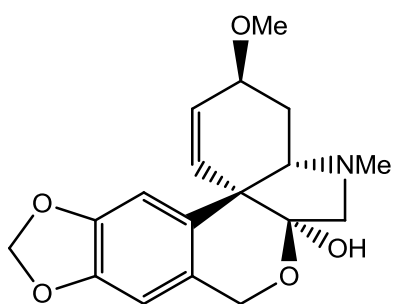
Tabulka 3. Alkaloidy krininového a haemanthaminového typu

Alkaloid	Struktura					
	 <div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 10px;"> <span>krininový typ</span> <span>haemanthaminový typ</span> </div>					
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>
haemanthaminový typ						
haemanthamin	-CH <sub>2</sub> -	-CH <sub>2</sub> -	H	OH	H	OMe
vitattin	-CH <sub>2</sub> -	-CH <sub>2</sub> -	H	H	H	OH
haemanthidin	-CH <sub>2</sub> -	-CH <sub>2</sub> -	OH	OH	H	OMe
bulbispermin	-CH <sub>2</sub> -	-CH <sub>2</sub> -	H	OH	H	OH
krinamin	-CH <sub>2</sub> -	-CH <sub>2</sub> -	H	OH	OMe	H
krininový typ						
krinin	-CH <sub>2</sub> -	-CH <sub>2</sub> -	H	H	H	OH
buphanisin	-CH <sub>2</sub> -	-CH <sub>2</sub> -	H	H	H	OMe

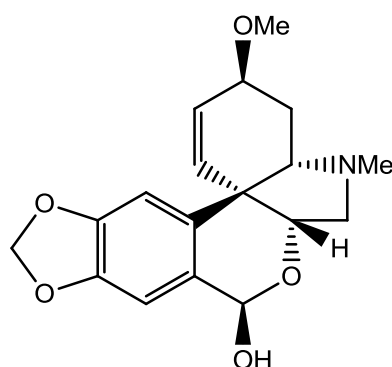
### 3.2.3.4 Alkaloidy tazettinového typu

Strukturním základem alkaloidů tazettinového typu je 2-benzopyrano[3,4-c]indol, který je stejně jako alkaloidy krininového a haemanthaminového typu odvozen od norbelladinu cyklizací typu *para-para*. Základním alkaloidem této skupiny je tazettin, jehož syntéza vychází z haemanthaminu přes chemicky nestálý prekurzor pretazettin<sup>25,33,35</sup>. Mezi další zástupce, které v této skupině můžeme nalézt, patří 3-epitazettin (kriwellin), makronin, ornamin, ornazidin nebo zeylamin<sup>27</sup>.

Jako zdroje těchto alkaloidů pak lze jmenovat rody *Eucharis*<sup>25</sup>, *Crinum*<sup>27,36</sup>, *Galanthus*<sup>34,36</sup>, *Hippeastrum*<sup>36</sup>, *Leucojum*<sup>36</sup>, *Narcissus*<sup>12</sup>.



tazettin

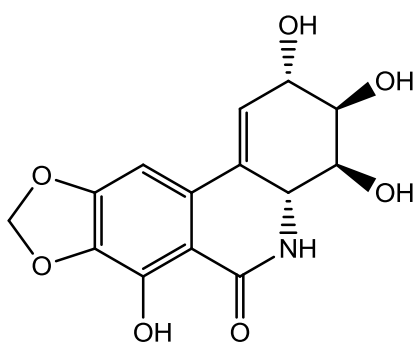


pretazettin

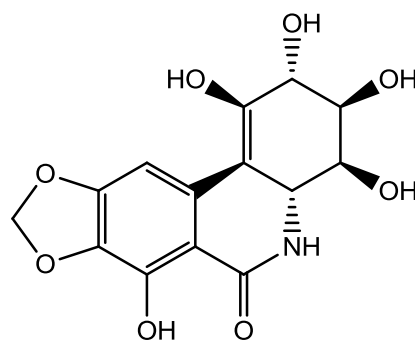
Obrázek 4. Alkaloidy tazettinového typu

### 3.2.3.5 Alkaloidy narciklasinového typu

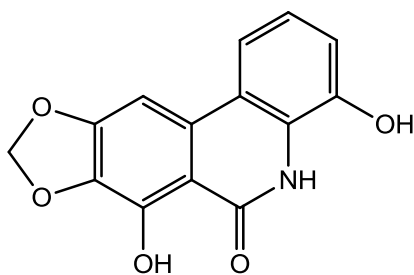
Skupina alkaloidů narciklasinového typu má jako strukturní základ fenantridin<sup>18</sup>. Z počátku nebylo zcela jasné, zda jejich syntéza probíhá cestou alkaloidů lykorinového typu anebo cestou alkaloidů krininového a haemanthaminového typu. V současnosti už je ale dokázána syntetická cesta podobná alkaloidům haemanthaminového typu<sup>37,18</sup>, jedná se tedy o oxidativní spojení typu *para-para*<sup>18</sup>. Mezi další alkaloidy této skupiny patří narciprimin, 7-deoxynarciklasin či pankratistatin<sup>37</sup>.



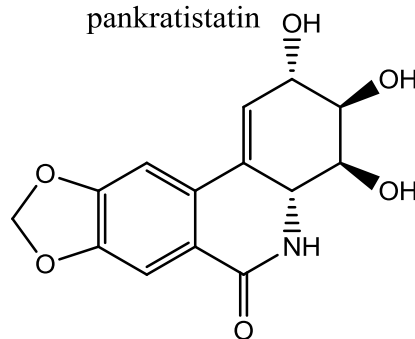
narciklasin



pankratistatin



narciprimin



7-deoxynarciklasin

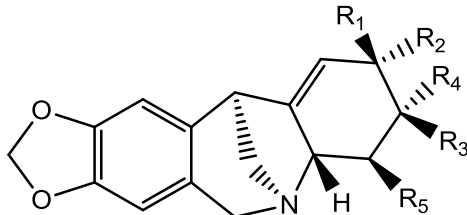
Obrázek 5. Alkaloidy narciklasinového typu

První izolace narciklasinu probíhala z různých druhů rodu *Narcissus*<sup>37</sup>, nicméně tyto alkaloidy můžeme najít i v rodech *Galanthus*, *Haemanthus*, *Leucojum* nebo *Pancratium*<sup>38</sup>.

### 3.2.3.6 Alkaloidy montaninového typu

Montaninové alkaloidy patří do skupiny alkaloidů odvozené od norbelladinu způsobem *para-para* oxidativní cyklizace<sup>18</sup>. Poprvé byly izolovány již v roce 1955, a protože izolace se většinou daří jen v menších množstvích a biologické vlastnosti jsou zajímavé, v současnosti je pozornost zaměřována na možné syntetické cesty. Ty jsou často odvíjeny od alkaloidů haemanthaminového typu. Základní strukturou této skupiny je 5,11-methanomorfantridin a ostatní jsou od něj odvozeny změnou konfigurace na C-2 a C-3. Konkrétně se jedná o alkaloidy montanin, pankracin, kokcinin, manthin nebo brunsvigin<sup>39,40</sup>.

Tabulka 4. Alkaloidy montaninového typu

Alkaloid	Struktura				
					
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>
montanin	H	OMe	OH	H	H
pankracin	H	OH	OH	H	H
manthin	H	OMe	OMe	H	H
kokcinin	OMe	H	OH	H	H
brunsvigin	H	OH	H	OH	H

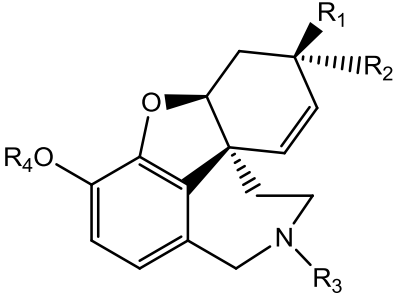
Z rostlinných zdrojů můžeme jmenovat rody *Narcissus* nebo *Pancratium*<sup>39</sup>.

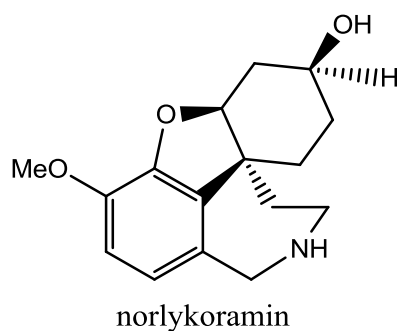
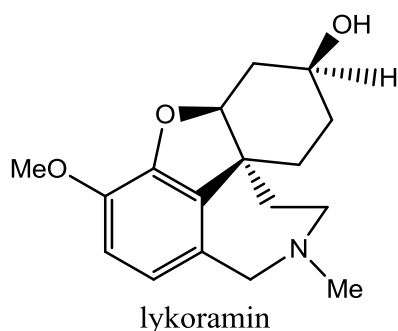
### 3.2.3.7 Alkaloidy galanthaminového typu

Alkaloidy galanthaminového typu představují jedinou skupinu, která vzniká oxidativním spojením *para-ortho*, jejímž základem je dibenzofuranové jádro<sup>18</sup>. Jako první byl roku 1952 z *Galanthus woronowii* izolován galanthamin, který díky své

biologické aktivitě ihned přitáhl pozornost<sup>41</sup>. Společně s lykoraminem je nejvíce se vyskytujícím alkaloidem této skupiny. Mezi další alkaloidy, které můžeme zařadit do této skupiny, patří norgalanthamin, narcisin, chlidantin, sanguinin, norlykoramin nebo leukoverin<sup>25</sup>.

Tabulka 5. Alkaloidy galanthaminového typu

Alkaloid	Struktura			
				
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>
galanthamin	OH	H	Me	Me
norgalanthamin	OH	H	H	Me
sanguinin	OH	H	Me	H
narcisin	OH	H	Ac	Me
chlidantin	OMe	H	Me	H



Obrázek 6. Alkaloidy galanthaminového typu

Rostlinných zdrojů je celá řada. Patří sem rody *Amaryllis*, *Hippeastrum*, *Lycoris*, *Leucojum*, *Galanthus*, *Narcissus*, *Zephyranthes* či *Crinum*<sup>22,41,42</sup>.

### 3.3 Biologická aktivita amarylkovitých alkaloidů

Jak již bylo zmíněno, amarylkovité alkaloidy představují zajímavé chemické struktury a především disponují širokým spektrem biologických aktivit. V současnosti je za nejzajímavější považována jejich protinádorová aktivita indukcí apoptózy a také inhibice acetylcholinesterasy, což je využíváno v terapii Alzheimerovy choroby. Dále se vyznačují i antibakteriálním, antivirovým nebo analgetickým působením<sup>7</sup>.

#### 3.3.1 Protinádorová aktivita

Nádorová onemocnění patří celosvětově mezi hlavní příčiny úmrtí ve vyspělých zemích a navíc se předpokládá, že incidence nádorů v rozvinutých zemích neustále poroste<sup>43</sup>. Příčinou tohoto růstu a obtížné léčby nádorových onemocnění je přítomnost multirezistentních nádorových buněk, které na léčbu neodpovídají a naopak jsou schopny růstu i šíření do jiných tkání. Mechanismů, které buňky ve své rezistenci uplatňují, můžeme najít vícero. Jedním z nich je přítomnost buněčných transportérů (dnes asi nejvýznamnější P-glykoprotein), které jsou schopné molekulu léčiva transportovat z buňky ven. Tyto transportéry patří do rodiny ABC proteinů, které pro přenos využívají energii získanou z ATP. V lidském genomu prozatím bylo objeveno asi 49 těchto transportérů, přičemž tři z nich (ABCB1, ABCC1, ABCG2) jsou uváděny jako příčiny vzniku rezistence k chemoterapii. Dalším mechanismem může být mutace tumor supresorového genu p53, který za normálních okolností reaguje na poškození DNA a je důležitý v procesu programované buněčné smrti. Funkční protein p53 v buňkách stimuluje transkripci proapoptotických molekul, zatímco mutovaná forma tuto schopnost ztrácí. Díky tomu, že mutovaná forma bývá nalezena až v 50% nádorových buněk, terapie směřovaná právě na tento protein by znamenala cílené působení v nádorových buňkách a menší poškození buněk zdravých<sup>43,45</sup>.

V rostlinné říši lze najít celou řadu zdrojů, které mohou být potenciálně využity jako léčiva nádorových onemocnění. Alkaloidy jako paklitaxel, vinblastin nebo vinkristin se již v terapii používají. Další skupinou látek, která je zatím intenzivně zkoumána, jsou právě alkaloidy čeledi Amaryllidaceae<sup>44,46</sup>. Jejich protinádorová aktivita, která je zprostředkována indukcí apoptózy, patří mezi nejdůležitější zkoumané účinky alkaloidů této rostlinné čeledi. Mezi velké přednosti patří i vysoká selektivita pro nádorové buňky, zatímco k buňkám zdravým nebo klidovým je toxicita výrazně nižší. Účinky se však

odvíjejí od konkrétní struktury<sup>7</sup>. Nejvíce zkoumané cytotoxické amarylkovité alkaloidy jsou nyní lykorin, narciklasin, pankratistatin a haemanthamin<sup>43</sup>.

### 3.3.1.1 Lykorinový strukturní typ

Alkaloidy lykorinového typu, jejichž hlavním zástupcem je lykorin, představují skupinu nejznámější a pravděpodobně také nejúčinnější v oblasti cytotoxicity. Sám lykorin se vyznačuje širší oblastí působení a kromě protinádorového účinku je schopen inhibovat biosyntézu kyseliny askorbové v rostlinách, je účinný proti některým virům (např. poliovirus) nebo prvokům (*Trypanosoma brucei*)<sup>7,19</sup>.

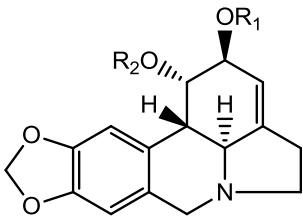
Protinádorové vlastnosti lykorinu byly testovány na řadě preklinických modelů lidských nádorů jak metodami *in vitro*, tak metodami *in vivo*, a to se zajímavými výsledky. Na některé nádorové buňky rezistentní k léčbě i apoptóze dokázal působit již ve velmi nízkých mikromolárních koncentracích<sup>47</sup>. Navíc se ukazuje, že jeho aktivita je až patnáctkrát vyšší vůči nádorovým buňkám než u buněk zdravých<sup>19</sup>. Působení tohoto alkaloidu se v některých *in vitro* studiích ukazuje být spíše cytostatické než cytotoxické a navíc v terapeutických koncentracích neindukuje apoptózu, ale pomocí modifikace aktinových vláken cytoskeletu snižuje proliferaci i schopnost migrace nádorových buněk. Některé výsledky poukazují i na to, že je schopen působit na rakovinné buňky bez ohledu na to, zda jsou rezistentní nebo citlivé k apoptóze<sup>19,46</sup>.

Důležité jsou i výsledky studia vztahů mezi strukturou a aktivitou, které následně mohou být užitečné při syntéze nových derivátů lykorinu. Jako účinné se ukázaly např. C1 a C2 estery lykorinu, které jsou lipofilnější, proto do buňky snáze proniknou a po hydrolýze uvnitř buňky se uvolní aktivní lykorin. Naopak substituce hydroxylovými nebo methylovými skupinami se ukázala jako neúčinná. Zdá se, že pro zachování protinádorové aktivity lykorinu je důležitá konformace C-kruhu, stereochemie na spojení kruhů C a D a také volné hydroxylové skupiny na kruhu C<sup>43,47</sup>.

Protinádorová aktivita lykorinu byla prokázána *in vivo* na buňkách myšího melanomu BL6 a také na buňkách Lewisova plicního karcinomu. Prokázání aktivity *in vitro* pak proběhlo na HeLa buňkách i dalších typech nádorových buněk (např. CEM, K562 nebo G-361)<sup>7</sup>. Další testování bylo provedeno např. na lidských leukemických buňkách HL-60, kde byla pozorována zástava buněčného cyklu, aktivace kaspas a poté apoptóza<sup>7,47</sup>. Účinný se ukázal být i při testech na dvou buněčných liniích kolorektálního adenokarcinomu (Caco-2 a HT-29), které byly spojené s mutací tumor supresorového

genu p53<sup>43</sup>. Ve studii<sup>46</sup> z roku 2010 je porovnáno i působení jiných alkaloidů lykorinového typu, kde bylo vybráno 22 sloučenin a šest nádorových buněčných linií rezistentních k apoptóze. Kromě lykorinu byly aktivní i např. galanthin, norpluvín nebo pseudolykorin, nicméně žádný z těchto alkaloidů nebyl účinnější než samotný lykorin.

Tabulka 6. Vybrané deriváty lykorinu a jejich *in vitro* inhibiční aktivita<sup>47</sup>

	Alkaloid		Buněčná linie, GI <sub>50</sub> (μM)		
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	Hs683	U373	MCF7
	H	Bz	4	0,6	5
	Bz	H	6	1	23
	H	Ac	11	4	4
	TIPS	Ac	36	15	26
	Allyl	Allyl	2	0,03	0,2
	Me	H	36	-	>100

"-" = nebylo testováno; TIPS = triisopropylsilyl

### 3.3.1.2 Narciklasinový strukturní typ

Tato skupina látek, v literatuře také označována jako isocarbostyrilové alkaloidy, vykazuje v oblasti cytotoxicity zajímavé účinky. Nejdůležitějšími zástupci z hlediska protinádorového působení jsou narciklasin a pankratistatin<sup>7,47</sup>.

Narciklasin je alkaloid, který byl v roce 1967 poprvé izolován z různých druhů rodu *Narcissus*. Ještě téhož roku u něj Cerioti popsal protinádorový účinek. Na základě jeho studií<sup>63</sup> narciklasin vykazoval silný antimitotický efekt podobný kolchicinu již ve velmi nízkých koncentracích. V dalších letech bylo prokázáno, že účinek vychází z interakce narciklasinu s eukaryontními ribozomy (konkrétně s podjednotkou 60S), kde inhibuje tvorbu peptidových vazeb a tím celou proteosyntézu. Dále byla zkoumána i interakce s DNA a RNA, nicméně tady narciklasin vykazoval aktivitu velmi slabou nebo dokonce žádnou<sup>37,49,50</sup>. Novější studie s buňkami lidského karcinomu prsu ML-7 a karcinomu prostaty PC-3 ukázaly, že narciklasin je schopen v těchto buňkách indukovat apoptózu přes receptory smrti, což je spojeno s aktivací kaspas 8 a 10<sup>50</sup>. Ukazuje se ale, že tato cytotoxicita je umožněna pouze při koncentracích vyšších než 1 μM, zatímco v koncentracích nižších je jeho účinek spíše cytostatický. Tato skutečnost byla popsána *in vivo* na modelech mozkových nádorů. Mechanismus zde nebyl přesně popsán, ale předpokládá se ovlivnění aktinových vláken v cytoskeletu<sup>47,50</sup>. Zajímavým a důležitým

faktem také je, že aktivita tohoto alkaloidu je v nádorových buňkách až 250krát vyšší, než v normálních buňkách lidského fibroblastu<sup>47,49</sup>.

Pankratistatin byl poprvé získán až v roce 1984 z cibulí havajské lilie *Hymenocallis littorale*<sup>49,51</sup>. První testy jeho protinádorové aktivity byly prováděny v roce 1993 a to hned na šedesáti buněčných liniích, mezi kterými byly buňky tkání plic, střeva, ledvin, mozku nebo leukemické buňky. Výsledky ukázaly inhibici růstu HeLa buněk, velmi dobré působení proti leukemickým buňkám i účinky proti dalším typům nádorů<sup>7,51</sup>. Navíc bylo prokázáno, že je pankratistatin vysoce selektivní k nádorovým buňkám. Ve studii<sup>52</sup> z roku 2010 se uvádí, že pankratistatin již v 1  $\mu$ M koncentraci dokázal po 48 hodinách indukovat apoptózu u více než 80% testovaných leukemických buněk a to bez porušení buněk zdravých. Velmi podobného výsledku bylo dosaženo o rok později ve studii<sup>53</sup>, kde byly účinky pankratistatinu testovány na dvou buněčných liniích kolorektálního karcinomu (p53-mutovaný H29 a p53-wild type HCT 116) spolu se zdravými buňkami střeva CCD-18Co. I zde působil pankratistatin cytotoxicky a vyvolával buněčnou smrt pouze u nádorových buněk. Účinky pankratistatinu jsou cílené na buněčné mitochondrie, kde narušuje potenciál mitochondriální membrány a způsobí tak kolaps buňky. Prokázáno bylo i snížení syntézy ATP a zvýšení množství ROS<sup>7,49</sup>.

### 3.3.1.3 Haemanthaminový a krininový strukturní typ

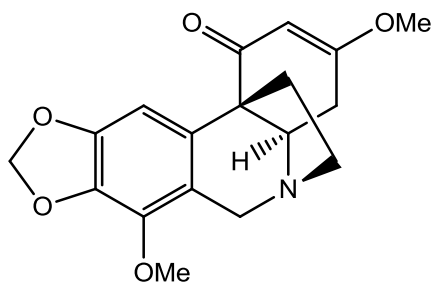
Z hlediska cytotoxicity jsou nejdůležitější alkaloidy této skupiny haemanthamin, haemanthidin a krinamin. Z dalších látek schopných inhibovat buněčný růst pak můžeme jmenovat maritidin nebo papyramin. Během studie osmi alkaloidů této skupiny se podařilo pouze u krinaminu a haemanthaminu prokázat selektivní účinek k nádorovým buňkám bez zasažení buněk zdravých<sup>7,18</sup>.

Protinádorová aktivita haemanthaminu i haemathidinu už byla prokázána na celé řadě buněčných linií. (např. HeLa buňky nebo buňky myšího lymfomu L5178)<sup>54</sup>. Dále podle výsledků z roku 2015<sup>44</sup> vykazují antiproliferativní účinky na buňkách lidských tumorů vaječníků, plic a střeva. Na dvou p-53 mutovaných liniích kolorektálního karcinomu (Caco-2 a HT-29) pak byla potvrzena cytotoxicita s minimálním poškozením zdravých buněk střeva<sup>43</sup>. I přes to však mechanismus působení prozatím není příliš objasněn<sup>54</sup>. Nejdříve se předpokládalo, že se haemanthamin váže na ribosomální podjednotku 60S a blokuje tak proteosyntézu. Později se však na buňkách myšího lymfomu L5178 ukázalo, že inhibice růstu spočívá v tvorbě komplexů s RNA<sup>7</sup>. V novější



studii<sup>54</sup> z roku 2014 byl mechanismus působení zkoumán na mutovaných p53 Jurkat buňkách (leukemické T-lymfocyty), kde se ukázalo, že haemathamin a haemanthidin v buňkách ovlivňují více procesů. Jednak mohou zvyšovat apoptózu na základě aktivace kaspas (především kaspasy 9 a 3), jednak mohou snižovat potenciál na mitochondriální membráně, podobně jako pankratistatin, a také mohou způsobit zástavu buněčného cyklu. Podle této studie se haemanthidin ukázal jako alkaloid potenciálně lépe využitelný v praxi, jak pro svoji vyšší účinnost, tak pro vyšší rozpustnost ve vodě a tedy jednodušší tvorbu aplikační formy.

Zajímavou látkou ze skupiny krininových alkaloidů je také distichamin. Jeho výskyt v čeledi Amaryllidaceae je vzácný a prozatím se ho podařilo získat pouze z afrického rodu *Boophone*. I přes to, že nepatří mezi běžně se vyskytující alkaloidy, jeho biologická aktivita byla testována hned několikrát a výsledky byly pozoruhodné. Protinádorové působení bylo pozorováno hned na několika buněčných liniích, pro příklad na buňkách akutní lymfoblastické leukémie nebo buňkách lidského karcinomu prsu<sup>47,58,65</sup>. V roce 2013 byla publikována studie<sup>65</sup>, ve které bylo osm alkaloidů izolovaných z *Boophone haemanthoides* testováno vůči třem vybraným nádorovým buněčným liniím a normálnímu fibroblastu. Zde se distichamin společně s lykorinem ukázal být účinným jak proti nádorovým buňkám, tak bohužel i proti zdravému fibroblastu. Ke stejným výsledkům došli i vědci ve studii publikované o rok dříve<sup>64</sup>, kde byl distichamin spolu s dalšími amarylkovitými alkaloidy podroben testování vůči pěti nádorovým liniím (CEM, K562, MCF7, HeLa a G-361) a normálnímu fibroblastu. Účinný byl ve všech případech a navíc HeLa buňky vůči němu byly nejvíce citlivé. Tento výrazný protinádorový účinek patrně vychází ze struktury distichaminu, která je oproti ostatním krininovým alkaloidům mírně pozměněná. Dvojitá vazba, obvykle mezi C1 a C2, je zde mezi C2 a C3. Dalším znakem je přítomnost methoxy skupiny na C3 a keto skupiny na C1. Tyto vztahy mezi strukturou a reaktivitou jsou dále zkoumány. Mechanismus, kterým distichamin indukuje apoptózu, je pravděpodobně přes aktivaci kaspasy 3<sup>64,65</sup>.



Obrázek 7. Strukturní vzorec distichaminu

### 3.3.1.4 Tazettinový strukturní typ

Mezi nejdůležitější zástupce tohoto strukturního typu patří tazettin a jeho biosyntetický prekurzor pretazettin. Aktivita tazettinu není příliš zajímavá. Mírné cytotoxické působení bylo prokázáno na buňkách fibroblastu LMTK a stejně tak na leukemické buňky Rauscher působil velmi slabě.

Pretazettin je však z pohledu cytotoxicity alkaloidem mnohem zajímavějším a byla u něj prokázána účinnost proti celé řadě nádorových buněk. Ukazuje se jako jeden z nejúčinnějších alkaloidů proti lymfoidním buňkám Molt4 a zároveň je schopný se vázat na enzym reverzní transkriptáza, čímž může inhibovat i onkogenní viry jako je Rauscher virus. Dále bylo prokázáno, že v buňkách myšího lymfomu podporuje antiproliferační aktivitu doxorubicinu. Na buňkách fibroblastu LMTK ukazoval výrazně vyšší cytotoxickou aktivitu oproti tazettinu, stejně tak inhiboval buněčný růst HeLa buněk. Mezi další buňky, které byly na působení pretazettinu citlivé patří Rauscher leukemie, spontánní AKR lymfocytární leukemie nebo Lewisův karcinom plic<sup>7,18</sup>

Tabulka 7. *In vitro* inhibiční aktivita vybraných alkaloidů vůči některým buněčným liniím<sup>47,64</sup>

Alkaloid	Buněčná linie, IC <sub>50</sub> (μM)				
	A549	OE21	Hs683	U373	SKMEL-28
lykorin	4,3 ± 0,3	5,1 ± 0,4	6,7 ± 0,3	7,6 ± 0,2	8,5 ± 0,3
haemanthamin	4,5 ± 0,6	6,8 ± 0,7	7,0 ± 0,3	7,7 ± 0,5	8,5 ± 0,2
pseudolykorin	7,5 ± 0,4	7,7 ± 0,3	7,9 ± 0,2	7,8 ± 0,3	>10
amarbellisin	7,2 ± 0,3	6,7 ± 0,2	8,3 ± 0,3	7,3 ± 0,2	8,3 ± 0,2
haemanthidin	4,0 ± 0,4	3,7 ± 0,2	4,3 ± 0,2	3,8 ± 0,2	4,2 ± 0,2
lykorin-2-on	9,9 ± 0,5	>10	>10	>10	>10

Alkaloid	Buněčná linie, IC <sub>50</sub> (μM)				
	CEM	K562	MCF7	HeLa	G-361
lykorin	1,6 ± 0,0	3,6 ± 1,2	13,0 ± 2,9	10,6 ± 0,9	5,0 ± 0,3
haemanthamin	2,1 ± 0,4	3,4 ± 1,6	8,1 ± 3,3	7,0 ± 2,2	3,7 ± 0,4
distichamin	4,5 ± 1,6	4,1 ± 0,9	2,3 ± 0,8	2,2 ± 0,1	14,7 ± 0,1
buphanidrin	>50	>50	>50	>50	>50

### 3.3.2 Anticholinergní aktivita

Anticholinergní aktivita amarylkovitých alkaloidů je druhou nejdůležitější aktivitou těchto látek. Selektivní inhibice acetylcholinesterasy se uplatňuje především v léčbě Alzheimerovy choroby, kde už je nyní úspěšně používán galanthamin. Novější studie pak ukazují, že slibné anticholinergní účinky se objevují i u dalších alkaloidů z čeledi Amaryllidaceae, jako je sanguinin nebo 1-*O*-acetyllykorin, jejichž aktivita je galanthaminu minimálně velmi podobná, v některých případech i větší<sup>58,59</sup>. Všeobecně lze říci, že anticholinergní aktivitu vykazují především alkaloidy galanthaminového a lykorinového typu (mimo lykorin samotný)<sup>4</sup>.

#### 3.3.2.1 Alzheimerova choroba

Demence představují skupinu onemocnění, která jsou charakterizována poruchami intelektu až úpadkem osobnosti. Velmi významnou roli zde hraje věk, který je nejdůležitějším rizikovým faktorem a platí, že se vzrůstajícím věkem stoupá i počet nemocných. U pacientů se projevují především poruchou kognitivních funkcí, kam můžeme řadit poruchy paměti, vnímání, řeči nebo motoriky, což je dáno narušením hlavně korové vrstvy mozku. Typický pro demence je také postupný nástup příznaků a jejich neustálé zhoršování<sup>55,60</sup>.

Vůbec nejčastější příčinou demence je Alzheimerova choroba, která celosvětově postihuje zhruba 20 milionů lidí s tím, že toto číslo neustále roste. Počet nemocných ve věku 65 let je zhruba 10%. Každých pět let se počet pacientů přibližně zdvojnásobuje a ve věku nad 85 let už tedy AD zasahuje téměř 50% populace. Neustále se zvyšující počet nemocných tedy souvisí i s faktem, že moderní medicína je schopna stále více prodlužovat život a zvyšuje tak počet seniorů. Kromě vyššího věku však mezi rizikové faktory patří i výskyt AD, Parkinsonovy choroby nebo Downova syndromu v rodinné anamnéze, poranění hlavy, ženské pohlaví, nízké vzdělání nebo přítomnost izoformy e4 apolipoproteinu E<sup>57,59,60</sup>. Mezi příznaky této nemoci můžeme najít všechny příznaky demencí. Porušením korové vrstvy se objevují poruchy paměti – zhoršená krátkodobá paměť, neschopnost zapamatovat si nové poznatky, poruchy pozornosti a porucha dalších kognitivních funkcí. Postupně dochází k poruchám motoriky, objevují se poruchy tvorby řeči nebo neschopnost porozumět řeči a v pozdějších stádiích nemoci se u pacientů může změnit i emotivita a chování<sup>55</sup>.

### 3.3.2.1.1 Etiopatogeneze

AD patří mezi závažná neurodegenerativní onemocnění, které je charakterizováno postupným a nevratným odumíráním neuronů v určitých oblastech mozku, čímž se neustále prohlubuje mozková atrofie. Etiologie tohoto onemocnění prozatím není objasněna, ale z posmrtných studií je známo, že v mozku dochází k některým charakteristickým změnám, konkrétně k ukládání patologických proteinů, které pak vytváří tzv. senilní plaky a neurofibrilární klubíčka. Kromě toho je velmi důležitým znakem poškození systémů neurotransmiterů, především acetylcholinu, ale i glutamátu. Na vzniku nemoci se pak pravděpodobně podílejí i některé další mechanismy jako je nadměrná tvorba kyslíkových radikálů<sup>55,59</sup>.

Patologické proteiny, které se v mozku ukládají, se nazývají  $\beta$ -amyloid a  $\tau$ -protein.  $\beta$ -amyloid je protein štěpený z amyloidového prekurzorového proteinu (APP), který je tělu vlastní, ale za normálních okolností je štěpen jiným způsobem. U zdravého jedince z APP vznikají kratší fragmenty, které jsou rozpustné a některé mají i určitou funkci. U pacientů s AD je potom APP štěpen dvěma jinými enzymy (konkrétně se jedná o enzymy  $\beta$ - a  $\gamma$ -sekretasu), za vzniku delších vláken. Ty potom různým spojováním vytváří dlouhá vlákna  $\beta$ -amyloidu, která následně v extracelulárním prostoru kůry koagulují a vytváří plaky. Ty potom mohou v daném místě vyvolat zánětlivou reakci a přitáhnout tak další neurotoxické látky a navíc je  $\beta$ -amyloid schopen přímo v neuronech poškozovat mitochondrie. Pravděpodobně v důsledku této toxicity dochází i k degeneraci  $\tau$ -proteinu, který je hyperfosforylován, mění svou konformaci a začne se shlukovat do neurofibrilárních klubíček, která taktéž způsobují odumření neuronu<sup>55</sup>.

Faktorem, který je důležitý i pro léčbu, je změna v koncentracích acetylcholinu, který funguje jako neurotransmiter při přenosu informace z jednoho neuronu na druhý. U pacientů s AD se koncentrace acetylcholinu snižuje, což především v mozkové kůře a hipokampu vyvolává problémy s pamětí, učením, chováním a emocemi. Biologická role acetylcholinesterasy spočívá v rychlé hydrolýze acetylcholinu na synapsích, čímž ukončí jeho působení a dále nedochází k přenosu elektrického signálu na druhý neuron. Její výskyt byl však prokázán i mimo nervovou tkáň (např. v leukemických buňkách nebo lidském fibroblastu), kde se účastní regulace apoptózy. Na regulaci množství a působení acetylcholinu v mozku se však nepodílí jen samotná AChE, ale také enzym jí velmi podobný, butyrylcholinesterasa (BuChE), která je také schopna hydrolyzovat acetylcholin i některé další estery v organismu. U pacientů s AD může docházet ke

snížování množství AChE a dokonce i acetyltransferasy, která se účastní syntézy acetylcholinu, ale je prokázáno, že aktivita BuChE se zvyšuje, dokonce až o 90%. Tato zvýšená aktivita je pozorována především v nejvíce poškozených oblastech mozku, tedy v kůře a hipokampu, a udává se, že je spojena jak s  $\beta$ -amyloidem a senilními plakami, tak s neurofibrilárními klubíčky<sup>56,57,59</sup>.

Podle novějších poznatků se zdá, že v etiopatogenezi AD hrají důležitou roli i  $\alpha 7$  nikotinové receptory a především jejich interakce s  $\beta$ -amyloidem. Předpokládá se, že pokud je  $\beta$ -amyloid v nízké koncentraci a rozpustný, interakce s  $\alpha 7$  nikotinovým receptorem je v podstatě fyziologická a podporuje nervovou tkáň. Při zvýšení koncentrace  $\beta$ -amyloidu může však tato interakce vyvolávat cholinergní nerovnováhu. Zvýšená aktivace  $\alpha$ -7 nikotinového receptoru pak nejspíš může ovlivňovat složení proteinů cholinergních neuronů, fosforylaci  $\tau$ -proteinu, nervový růstový faktor a také může interagovat s AChE<sup>66</sup>.

### **3.3.2.1.2 Farmakoterapie**

Bohužel v současné medicíně zatím neexistuje způsob, kterým by se dala AD vyléčit. Používají se ale léky, které zmírňují průběh onemocnění a při včasném zahájení terapie může dojít k výraznému zmírnění příznaků i zpomalení průběhu nemoci.

První skupinou látek, které se v terapii úspěšně používají, jsou kognitiva. Jedná se o inhibitory cholinesteras s různou afinitou k AChE a BuChE, které zvyšují dostupnost acetylcholinu a zlepšují tak kognitivní funkce. Jako první se z této skupiny používal takrin, který je už dnes ale ve většině zemí stahován pro své vedlejší účinky. V současnosti je nahrazen donepezilem, galanthaminem a rivastigminem. První dva z nich jsou selektivní pouze k AChE, zatímco rivastigmin inhibuje AChE i BuChE. Všechna tato léčiva jsou určena k terapii mírných až středně těžkých forem onemocnění, ale ukazuje se, že působí i u těžších stádií<sup>55-57</sup>. Standardně se pro porovnávání účinků jednotlivých inhibitorů používá hodnota  $IC_{50}$ , která vyjadřuje koncentraci dané látky potřebnou pro vyvolání 50% účinku, v tomto případě koncentraci, která způsobí 50% inhibiční efekt.

Druhou skupinu léčiv, která jsou nyní k terapii AD schválena, představují antagonisté NMDA receptorů, jejichž jediným schváleným zástupcem je memantin. Kromě snížené hladiny acetylcholinu se totiž v mozku nemocných objevuje zvýšená aktivita excitačních aminokyselin, které pak právě nadměrnou interakcí s NMDA receptorem mohou způsobit poruchy paměti. Navíc dochází k iontové nerovnováze, do

buněk se dostává velké množství kalcia, které tak vyvolá až smrt neuronu. Memantin jako antagonist těchto receptorů působení aminokyselin na nich brání<sup>55</sup>.

Vzhledem k tomu, že všechna tato léčiva pouze zmírňují obtíže, snaží se vědci neustále o získání nových látek i nových cílů jejich působení tak, aby se dalo zabránit odumírání neuronů i zhoršování kognitivních funkcí. Nových potenciálně účinných molekul je celá řada, nicméně jen vybraní zástupci se dostanou až ke klinickému testování. Mezi cíle, na které se výzkum v dnešní době zaměřuje, patří jak  $\beta$ -amyloid, tak i  $\tau$ -protein (zde se hledají látky, které by působily přímo proti těmto proteinům a útvarům, které tvoří, ale i látky, které by předcházely jejich vzniku), neurotransmiterové systémy (cholinergní, glutamátový nebo serotoninový) a do budoucna se zdá být slibné zaměření se i na oxidační stres nebo poškození mitochondrií<sup>61</sup>. Mezi další potenciálně využitelné látky patří inhibitory POP. Jedná se o peptidasu, která dokáže hydrolyzovat peptidy obsahující aminokyselinu prolin. K tomuto štěpení dochází na karboxylovém konci prolinových zbytků. Mezi substráty POP můžeme najít látky jako je vazopresin nebo substance P, což jsou látky také důležité v procesech učení a paměti a jejich degradace tak může urychlovat rozvoj poruch právě těchto procesů i dalších kognitivních funkcí. Proto jsou dnes látky schopné inhibovat POP v hledáčku vědců nejen pro potenciální léčbu AD a jiných demencí, ale i schizofrenie nebo bipolární afektivní poruchy<sup>4</sup>.

### 3.3.2.2 Galanthaminový strukturní typ

#### 3.3.2.2.1 *Galanthamin*

Nejdůležitějším zástupcem této skupiny je bezesporu galanthamin. Tento alkaloid byl poprvé získán z *Galanthus woronowii*, ale následně byl identifikován i v řadě dalších zástupců čeledi amarylkovitých. Mezi ně patří další představitelé rodu *Galanthus*, ale i některé druhy z rodů *Narcissus*, *Lycoris* nebo *Leucojum*<sup>7,66,67</sup>. I přes to, že už jsou dnes známé syntetické cesty pro získávání galanthaminu, jeho izolace z přírodních zdrojů hraje stále nemalou roli v celém farmaceutickém průmyslu. Nejdříve byl získáván z *Galanthus nivalis*, ale protože obsahuje poměrně málo galanthaminu, došlo k nahrazení za *Leucojum aestivum* ve Východní Evropě, různé druhy narcisů ve Střední a Západní Evropě, *Lycoris radiata* v Číně a *Ungernia victoria* v Uzbekistánu a Kazachstánu<sup>41</sup>.

Už od svého objevení se tento terciární amin testoval především v léčbě různých neurodegenerativních onemocněních jako je dětská obrna nebo různé formy demence. Jeho účinky, které podporují paměť, zlepšují kognitivní i behaviorální symptomy u AD

byly postupně prokázány *in vitro*, *in vivo* i v klinických studiích. Proto se galanthaminu začala hodně věnovat pozornost a v roce 2000 byl FDA (úřad pro kontrolu potravin a léčiv) schválen jako lék k terapii Alzheimerovy choroby. K tomuto účelu se používá jeho hydrobromidová sůl, která je komerčně dostupná pod firemními názvy Reminyl<sup>®</sup>, Razadyne<sup>®</sup> nebo Nivalin<sup>®</sup>. Právě pod jménem Reminyl<sup>®</sup> se stal galanthamin úplně prvním alkaloidem z čeledi Amaryllidaceae, který byl schválen k terapeutickému užití a v současnosti tento alkaloid představuje jeden z nejvíce předepisovaných léků v terapii AD<sup>7,47,66,67</sup>.

Mechanismus působení galanthaminu je duální. Jednak je schopen inhibovat cholinesterasy a jednak stimuluje pre- i postsynaptické nikotinové receptory. Oba dva mechanismy vedou ke zvýšení hladin acetylcholinu a zlepšení příznaků AD. Výhodou galanthaminu je, že se dobře vstřebává a jeho působení je dlouhodobé (udává se poločas až sedm hodin). Navíc dokáže prostoupit přes hematoencefalickou bariéru a působit tak přímo v CNS. U zdravého jedince se AChE vyskytuje právě v CNS a také v erytrocytech a kosterním svalstvu, zatímco BuChE je především v plasmě a hepatocytech. Jak ale bylo zmíněno výše, u pacientů s AD se i BuChE vyskytuje v mozku v souvislosti se senilními plakami ve zvýšeném množství. Ukázalo se, že galanthamin je schopen inhibovat oba dva enzymy, ale k AChE vykazuje až 53x větší selektivitu. Inhibici zajišťuje jako reversibilní a kompetitivní inhibitor, což znamená, že se váže přímo do aktivního místa enzymu, čímž ho inhibuje a nedojde k odbourání acetylcholinu. Na nikotinových receptorech působí mechanismem alosterické modulace. Neváže se tedy přímo do aktivního místa receptoru, jako to dělají jeho agonisté, ale upravuje a reguluje funkci receptoru vazbou na jinou část proteinu, který receptor tvoří. Tato vazba tak přímo receptor neaktivuje, ale ovlivňuje jeho funkci po navázání ligandu. Nikotinových receptorů existuje více typů. Galanthamin své působení zprostředkovává hlavně přes vazbu na  $\alpha 7$ -nikotinové receptory, které se nachází v mozku a vyvolá na nich zvýšenou aktivitu jejich přirozených ligandů, mimo jiné dojde ke zvýšení aktivity acetylcholinu<sup>7,18,66,67</sup>.

#### **3.3.2.2.2 Ostatní zástupci galanthaminového strukturního typu**

Inhibiční aktivitu vůči AChE i BuChE vykazuje větší množství sumárních extraktů získaných z rostlin čeledi Amaryllidaceae. Patří mezi ně extrakty z *Chlidanthus fragrans*, *Nerine bowdenii*, *Zephyranthes robusta* nebo různí představitelé rodu *Narcissus*<sup>58,70</sup>. Alkaloidy, které v těchto extraktech můžeme najít, jsou různé, nicméně jejich aktivita a složení napovídají, že na inhibici cholinesteras se ve všech případech pravděpodobně

nejvíce podílely alkaloidy galanthaminového a lykorinového strukturního typu<sup>58</sup>. Není tedy divu, že po úspěšném zavedení galanthaminu do praxe se začalo intenzivněji pátrat i po dalších aktivních strukturách. Většina změn ve struktuře galanthaminu znamená spíše snížení nebo úplnou ztrátu aktivity, ale už byly objeveny i struktury aktivnější, než je sám galanthamin<sup>68</sup>. Z alkaloidů, které byly méně aktivní, můžeme jmenovat narwedín, který má keto skupinu na C3 a nebo *N*-demethylgalanthamin, kterému chybí methylová skupina na dusíkovém atomu. Mezi neaktivní alkaloidy patří lykoramin nebo epinorlykoramin, u kterých za ztrátu inhibiční aktivity vůči cholinesterasám může nejspíš hydrogenace dvojné vazby C4-C4a<sup>4,68,69</sup>.

Dalším zkoumaným alkaloidem byl například chlidanthin, což je poziční izomer galanthaminu. Jedná se o vzácnější alkaloid, jehož izolace proběhla poprvé před více než 50 lety z *Chlidanthus fragrans* a od té doby byl nalezen pouze v *Haemanthus multiflorus*, *Hippeastrum robustum* a *Zephyrathes concolor*. Ve studii<sup>69</sup> z roku 2011 byla objasněna jeho struktura i testována aktivita společně s galanthamin *N*-oxidem. Aktivita chlidanthinu byla oproti galanthaminu asi 5-krát slabší, což se vysvětluje absencí intramolekulární vazby mezi kyslíkem na dihydrofuranovém jádře a hydroxylem na C3, která se zdá být jednou z klíčových právě pro inhibici AChE. Galanthamin *N*-oxid v této studii vykazoval také slabší účinky, obdobné účinkům chlidanthinu, což je v souladu se zmíněnou hypotézou<sup>4,69</sup>. V další studii<sup>4</sup>, která vznikla o dva roky později, byly potvrzeny účinky chlidanthinu získaného z *Chlidanthus fragrans*, kde byla stanovena  $IC_{50HuAChE} = 147 \pm 6 \mu M$  a  $IC_{50HuBuChE} = 422 \pm 15 \mu M$ .

Mezi alkaloidy, které se naopak ukazují jako silnější inhibitory cholinesteras, patří sanguinin. Jedná se o 9-hydroxy analog galanthaminu, který byl izolován z *Pancratium illyricum* či *Eucharis grandiflora*. Předpokládá se, že příčinou jeho výrazné aktivity je právě záměna methoxy skupiny v poloze 9 galanthaminu za skupinu hydroxylovou, která se lépe váže v aktivním místě AChE. Podle studie<sup>70</sup> z roku 2002 je sanguinin s  $IC_{50AChE} = 0,1 \pm 0,01 \mu M$  zhruba 10-krát aktivnější než samotný galanthamin, u kterého byla naměřena  $IC_{50AChE} = 1,07 \pm 0,18 \mu M$ . Nevýhodou ale je, že sanguinin je alkaloid vzácný, vyskytuje se v malém množství, což výrazně omezuje jeho případné zavedení do praxe<sup>47,70</sup>.

Velmi účinné jsou i *N*-alkylové deriváty galanthaminu, které byly připraveny synteticky, ale dva už byly objeveny i v přírodě. Jedná se o *N*-allylnorgalanthamin a *N*-(14-methylallyl)norgalanthamin. Oba dva tyto alkaloidy se podařilo izolovat



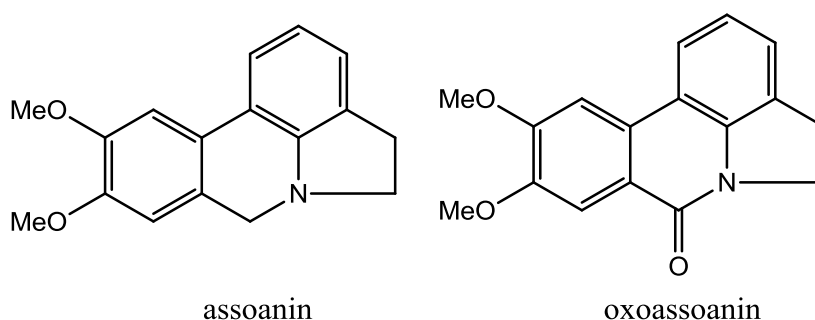
z *Leucojum aestivum* a v porovnání s galanthaminem vykazují přibližně 10-krát silnějšími inhibiční účinky vůči AChE<sup>67,68</sup>

### 3.3.2.3 Lykorinový strukturní typ

Všeobecně se uvádí, že spolu s alkaloidy galanthaminového typu jsou alkaloidy lykorinového typu látky, které jsou schopné inhibovat acetylcholinesterasu a případně se tak uplatňovat v terapii AD. V porovnání s galanthaminem je ale jejich inhibiční aktivita většinou o něco slabší a udává se, že je závislá především na substituci v poloze C1 a C2 lykorinu.

I přes to, že samotný lykorin vůči AChE žádnou aktivitu nevykazuje, jeho deriváty (ať už se jedná o alkaloidy přirozeně se vyskytující v rostlinách nebo o látky získané syntetickými cestami) se intenzivně zkoumají. Mezi nejznámější analoga odvozená od lykorinu patří 1-*O*-acetyllykorin, který se zdá být až dvakrát účinnější, než galanthamin. Naopak další acetylované deriváty (2-acetyllykorin a 1,2-diacetyllykorin) dokáží inhibovat AChE jen velmi málo nebo vůbec. Z tohoto můžeme usuzovat, že pro alkaloidy lykorinového typu je při inhibici acetylcholinesterasy klíčová substituce na C1<sup>47,62</sup>.

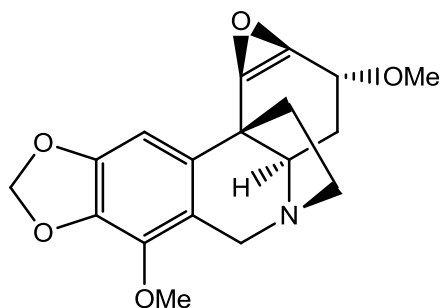
Ve studii<sup>70</sup> publikované v roce 2002 byla testována inhibiční aktivita 23 amarylkovitých alkaloidů různých strukturních typů. Ze zástupců lykorinového strukturního typu se jako nejaktivnější ukázali assoanin a oxoassoanin. Tyto alkaloidy sice způsobovaly inhibici AChE, ale aktivita byla čtyřikrát menší než u galanthaminu. Předpokládá se, že za tuto aktivitu je zodpovědný aromatický kruh C, který dodá molekule planaritu.



Obrázek 8. Vybrané struktury lykorinového typu

### 3.3.2.4 Krininový a haemanthaminový strukturní typ

V literatuře se uvádí, že alkaloidy krininového i haemanthaminového strukturního typu jsou slabé inhibitory acetylcholinesterasy. Stereochemie na 5,10*b*-ethano můstku tuto aktivitu nijak neovlivňuje. V roce 2013 byla publikována studie<sup>4</sup>, zmiňována již dříve v této práci, ve které byla u 11 alkaloidů získaných z *Chlidanthus fragrans* testována inhibiční aktivita vůči HuAChE, HuBuChE a POP. Z alkaloidů krininového typu byl jediným zajímavým undulatin. Jeho aktivita vůči HuAChE byla sice více jak 10-krát slabší, než aktivita galanthaminu, HuBuChE neinhiboval vůbec, ale byla u něho zjištěna relativně zajímavá schopnost inhibovat POP ( $IC_{50POP} = 1,96 \pm 0,12 \text{ mM}$ )<sup>4</sup>. V následujícím roce (2015) byl undulatin studován za použití AChE z elektrického úhoře, kde vykazoval velice zajímavou aktivitu ( $IC_{50POP} = 7,4 \pm 0,03 \text{ }\mu\text{M}$ )<sup>78</sup>. Navíc byla tato látka studována na schopnost přestupu přes hematoencefalickou bariéru za využití testu propustnosti přes paralelní umělé membrány (PAMPA-BBB), což je metoda, která byla vyvinuta pro odhad schopnosti látky projít pasivní difuzí přes biologickou membránu. Na základě této studie bylo zjištěno, že undulatin je schopný přestupu přes hematoencefalickou bariéru<sup>78</sup>.



Obrázek 9. Strukturní vzorec undulatinu

Tabulka 8. Vybrané alkaloidy a jejich inhibiční cholinesterasová aktivita

Alkaloid	IC50, AChE (μM)	IC50, BuChE (μM)	Cit.
galanthamin	1,71 ± 0,06	42,30 ± 1,30	4
chlidanthin	147,00 ± 6,00	422,00 ± 15,00	4
undulatin <sup>a</sup>	23,00 ± 1,00	>1000	4
undulatin <sup>b</sup>	7,40 ± 0,03	-	78
sanguinin	0,10 ± 0,01	-	70
assoanin	3,87 ± 0,24	-	70
11-hydroxygalanthamin	1,61 ± 0,21	-	70
pseudolykorin	152,32 ± 32,06	-	70
leukotamin	5,30 ± 0,90	-	47
1- <i>O</i> -acetyllykorin	0,96 ± 0,04	-	47
lykorin	213,00 ± 1,00	>1000	4, 47
krinin	461,00 ± 14,00	-	47
tazettin	705,00 ± 63,00	-	47

"-" = nebylo testováno, <sup>a</sup> HuAChE, <sup>b</sup> AChE z elektrického úhoře

### 3.3.3 Antibakteriální aktivita

Antibakteriální aktivita amarylkovitých alkaloidů je oblastí prozatím méně prozkoumanou. I přes to, že řada rostlin je používána v lidovém léčitelství a u několika sumárních extraktů různých druhů čeledi Amaryllidaceae už byla úspěšně testována antibakteriální aktivita, informací o účincích konkrétních alkaloidů je zatím poměrně málo<sup>71</sup>.

Nejvíce je zkoumána aktivita představitelů rodu *Crinum*, z kterého byl izolován krinamin a byla u něj prokázána silná aktivita proti *Staphylococcus aureus*<sup>73</sup>. Zajímavé účinky byly pozorovány u extraktu z *Crinum purpurascens*, který byl účinný proti šesti testovaným bakteriím (např. *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Staphylococcus aureus*) a jeho minimální inhibiční koncentrace i minimální baktericidní koncentrace byly zhruba dvakrát větší, než u použitého standardu ciprofloxacinu. Zajímavým faktem také je, že zatímco sumární extrakt byl takto aktivní, jednotlivé látky z něj izolované proti stejným bakteriím nepůsobily vůbec nebo jen velmi málo<sup>72</sup>. Ve studii<sup>73</sup> z roku 2014 byl testován extrakt z celé rostliny *Crinum angustum*. I zde byly výsledky poměrně příznivé, nicméně

nebyly testovány jednotlivé alkaloidy a pouze s ohledem na dostupnou literaturu autoři předpokládají, že hlavní roli v tomto extraktu hrály vittatin a krinamin.

Pro studii<sup>71</sup> publikovanou v roce 2012 bylo výchozím bodem lidové léčitelství, které využívá africkou rostlinu *Boophone disticha* k léčbě různých poranění i infekcí. Proto právě tato rostlina byla vybrána k testování antimikrobiální aktivity. Testován byl sumární extrakt z cibulí a také dva alkaloidy krininového typu distichamin a buphanidrin, které se podařilo z tohoto extraktu získat. Proti dvěma grampozitivním (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*) a dvěma gramnegativním (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*) bakteriím působil už samotný extrakt. Každý alkaloid zvlášť se ale ukázal jako dvakrát účinnější a nejlepší naměřená MIC (minimální inhibiční koncentrace) byla stanovena na 0,0063 mg/ml.

Antibakteriální aktivita byla prokázána i u alkaloidů lykorinového typu a to především proti gramnegativní bakterii *Flavobacterium columnare*, která u ryb způsobuje onemocnění známé jako bakteriální rozpad ploutví. Zde se jako aktivní alkaloidy prokázaly lykorin a jeho deriváty, nejlépe disubstituované v polohách C1 a C2. Zjistilo se, že velmi aktivní je i ungeremin, který je dokonce aktivnější, než lykorin i jeho analoga. Látky odvozené od ungereminu však aktivitu ztrácí<sup>47</sup>.

### 3.3.4 Antiplasmodiální aktivita

Malárie je infekční onemocnění, jehož výskyt se celosvětově neustále zvyšuje a proti kterému je třeba stále hledat nové účinné látky, protože ty současné přestávají být dostatečně účinné. Původci onemocnění jsou prvoci z rodu *Plasmodium*, kteří jsou přenášeni samičkami komárů z rodu *Anopheles*<sup>47,75</sup>.

Jako aktivní se ukazují být alkaloidy haemanthaminového typu, u kterých pravděpodobně za účinky stojí dvojná vazba na C1-C2 a volná hydroxylová skupina na C11<sup>47</sup>. Ve studii<sup>75</sup> z roku 2003 bylo testováno sedm alkaloidů proti dvěma druhům *Plasmodium falciparum* (chlorochin-senzitivní T9.96 a chlorochin-rezistentní K<sub>1</sub>). Nejlepších výsledků zde dosáhli haemanthamin, 6-hydroxyhaemanthamin a lykorin, zatímco galanthamin a tazettin účinkovali jen velmi málo, nejspíš proto, že ve své struktuře obsahují *N*-methylovaný postranní řetězec.

Často testovaný je lykorin a jeho přírodní i syntetické deriváty. Ve studii<sup>74</sup> publikované v roce 2010 bylo testováno 27 derivátů lykorinu proti chlorochin-senzitivnímu kmenu *Plasmodium falciparum*. Výsledky ukázaly, že pro

antiplasmodiální aktivitu jsou důležité volné hydroxylové skupiny na C1 a C2, případně zde mohou být estery (acetát nebo isobutyryl). Důležitá se zdá být i přítomnost dvojné vazby na C2-C3. Nejúčinnější byl samotný lykorin, mezi účinná analoga patřil 1,2-diacetyllykorin nebo 1,2-bis(2-methylbutyryl)lykorin<sup>74</sup>. Testování analogů lykorinu proti původcům malárie už probíhalo i *in vitro*. Zde se jako nejúčinnější proti oběma typům (chlorochin-senzitivní i chlorochin-rezistentní) *Plasmodium falciparum* ukázaly např. 1,2-di-*O*-butanoyllykorin, 1-*O*-propanoyllykorin nebo 1-*O*-(3*R*)-hydroxybutanoyllykorin<sup>47</sup>.

### 3.3.5 Antiparazitická aktivita

*Trichomonas vaginalis* je prvok, který u člověka zasahuje urogenitální trakt a je jednou z nejčastějších příčin nevirových sexuálně přenosných onemocnění. V současnosti se k léčbě těchto onemocnění používá metronidazol, ovšem jeho potenciální mutagenita i zvyšující se počet metronidazol-rezistentních prvoků nutí vědce k vývoji nových účinných látek.

I proti tomuto prvokovi se jako účinný ukazuje lykorin, který dokáže ovlivnit buněčný cyklus a tím vyvolat smrt. Volné hydroxylové skupiny na C1 a C2 zde nejsou nezbytností pro účinek. Naopak esterifikace v těchto polohách se zdá být výhodnou. Aktivní jsou mono- i disubstituované deriváty, ale pro antiparazitickou aktivitu je důležitější esterifikace v poloze C2, kde nejlepší výsledky dosahuje 2-*O*-lauroyllykorin<sup>47,76</sup>.

### 3.3.6 Další aktivity

Mezi další prokázané účinky amarylkovitých alkaloidů patří antivirová aktivita. I zde je výrazným zástupcem lykorin a jeho deriváty, se kterými byla provedena řada testů proti různým skupinám virů, kde některé testy přinesly zajímavé výsledky. Je prokázáno, že lykorin inhibuje flavivirusy prostřednictvím potlačení syntézy jejich RNA. Dále se ukázal jako silný inhibitor chřipkového viru A, konkrétně typu N5H1, a také byl schopný potlačit lidský enterovirus 71. Spolu s dalšími alkaloidy (haemanthaminem, homolykorinem) prokázal i působení proti HIV-1 viru<sup>47,69</sup>.

Zajímavá je studie<sup>77</sup> z roku 2006, ve které byl testován montanin izolovaný z *Hippeastrum vittatum*. Tento alkaloid *in vitro* prokázal antikonvulzivní a anxiolytické účinky vyvolané bloádou chloridových kanálů na GABA receptorech, obdobně jako

benzodiazepiny, které se v terapii používají<sup>77</sup>. Dále se ukázalo (prozatím *in vitro*), že montanin dokáže reagovat se serotoninovými receptory přítomnými v mozku. Schopnost inhibovat serotoninové, noradrenalinové a dopaminové transportéry v mozku byla také objevena u distichaminu, buphanidrinu a buphanisinu izolovaných z cibulí *Boophone disticha*. Těchto zajímavých vlastností by se potenciálně dalo využít v terapii depresí<sup>47</sup>.

## **4 Experimentální část**

### **4.1 Použité metody**

#### **4.1.1 Destilace**

Všechna použitá rozpouštědla byla nejprve přečištěna destilací. Následně byla uchovávána v hnědých lahvích nebo plechových kanystrech.

#### **4.1.2 Tenkovrstvá chromatografie**

Pro tenkovrstvou chromatografii (TLC) byly používány skleněné desky se silikagelem. Pro dělení a izolaci menších množství látek v pozdější fázi práce už byly používány komerčně vyráběné hliníkové destičky pokryté silikagelem.

Vyvíjení desek probíhalo ve skleněných komorách, které byly mobilní fází syceny minimálně 20 minut.

Na základě UV detekce byly z každé desky izolovány jednotlivé rozdělené zóny.

#### **4.1.3 Promývání**

Izolované frakce z TLC byly promývány pomocí rozpouštědel přes vrstvu vaty, případně ještě přes vrstvu hliníku pro důkladnější přečištění.

#### **4.1.4 Odpařování**

Odpařování rozpouštědel ze vzorků bylo prováděno pomocí vakuové odparky Büchi Rotavapor R 114 vybavené vodní lázní Büchi Waterpath B-480 při 60°C za sníženého tlaku. Získané suché vzorky byly zpracovávány dále a rozpouštědla po přečištění destilací byla používána pro další výzkumné práce.

### **4.2 Použitý materiál**

#### **4.2.1 Rozpouštědla**

Cyklohexan, p.a. (Penta)

Diethylamin, p.a. (Penta)

Ethanol, p.a. (Penta)

Ethylacetát, p.a. (Penta)

Chloroform, p.a. (Penta)

Toluen, p.a. (Penta)

## 4.2.2 Chemikálie

Dragendorfovo činidlo – detekční činidlo

## 4.2.3 Vyvíjecí soustavy pro TLC

S1:	To : cHx : DEA	50 : 50 : 5	(toluen, cyklohexan, diethylamin)
S2:	EtOAc : DEA	9:1	(ethylacetát, diethylamin)
S3:	To : EtOAc : DEA	45 : 45 : 10	(toluen, ethylacetát, diethylamin)
S4:	To : DEA	95 : 5	(toluen, diethylamin)
S5:	cHx : DEA	9 : 1	(cyklohexan, diethylamin)

## 4.2.4 Adsorbenty pro TLC

A1: Silikagel LS 5/40 UV254; pro preparativní TLC

A2: Kieselgel 60 F254, Merck; hliníková deska o rozměrech 20 x 20 cm s vrstvou silikagelu pro tenkovrstvou chromatografii; tloušťka vrstvy 0,2 mm.

## 4.3 Izolace alkaloidů

### 4.3.1 Biologický materiál

Čerstvé cibule *Chlidanthus fragrans* byly získány v roce 2010 od komerčního dodavatele Lukon Glads (Sadská, Česká republika). Vzorek je také uložen v herbáři na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie, Farmaceutické fakulty v Hradci Králové.

### 4.3.2 Příprava alkaloidního extraktu

Příprava alkaloidního extraktu a zpracování tohoto extraktu pomocí sloupcové chromatografie nebyla předmětem této diplomové práce. Detailní popis těchto postupů je možno nalézt v následující práci (Cahlíková et al., 2011)<sup>62</sup>.

Příprava alkaloidního extraktu a jeho sloupcová chromatografie byla provedena Mgr. Andreou Krejčí, Ph.D. v rámci její doktorské práce v roce 2010.



### 4.3.3 Frakce použité pro izolaci alkaloidů

Pro izolaci alkaloidů byla použita frakce číslo 7, která zůstala z předcházejících fytochemických prací prozatím nezpracována. Na základě GC-MS analýzy byla v této frakci zjištěna přítomnost zajímavých látek doposud neizolovaných ze studované rostliny.

### 4.3.4 Preparativní tenkovrstvá chromatografie

#### 4.3.4.1 Příprava desky

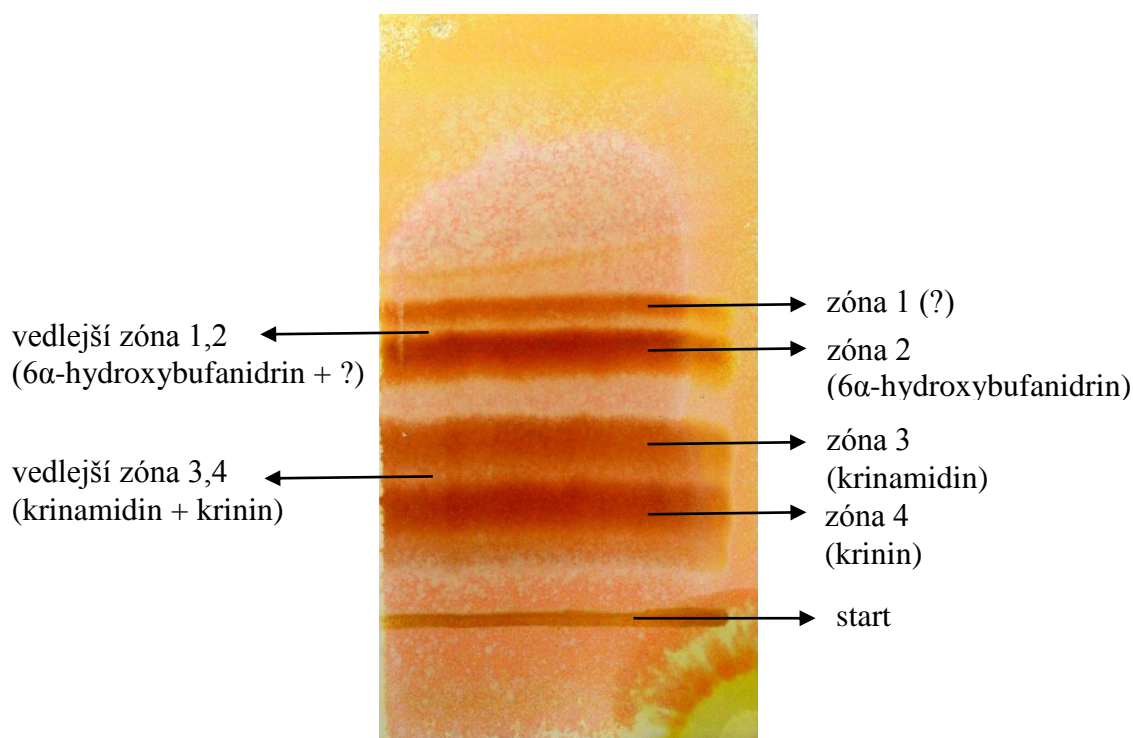
Skleněná deska o rozměrech 15 x 15 cm byla nejprve očištěna a odmaštěna chloroformem. Poté na ni byla rovnoměrně rozetřena vrstva silikagelu A1, který byl upraven podle pokynů výrobce. Do druhého dne se pak deska nechala vyschnout a zatuhnout.

#### 4.3.4.2 Výběr vhodné vyvíjecí soustavy pro preparativní TLC

Malé množství alkaloidního extraktu bylo rozpuštěno v chloroformu a kapilárou nanášeno na dvě desky s adsorbentem A2. První deska byla vyvíjena ve skleněné komoře nasycené mobilní fází S1 a na druhou desku byla použita soustava S2. Vhodnost jednotlivých soustav byla posuzována podle jejich schopnosti oddělit od sebe alkaloidy obsažené v extraktu, které byly na deskách detekovány pod UV zářením a pomocí Dragendorfova činidla. Jako vhodná se ukázala být soustava S2, která tak byla použita pro další práci.

#### 4.3.4.3 Dělení alkaloidního extraktu

1,10 g alkaloidního extraktu z *Chlidanthus fragrans* bylo rozpuštěno ve 3 ml chloroformu a postupně nanášeno na připravené skleněné desky. Jednotlivé desky byly následně vyvíjeny ve zvolené mobilní fázi S2. Po odpaření rozpouštědla z vyvinuté desky došlo za pomoci UV detekce k separaci celkem 4 hlavních zón a 2 zón vedlejších, které se nacházely mezi dvěma hlavními zónami (první z nich mezi zónami 1 a 2 a druhá mezi zónami 3 a 4; Obr. 10).



Obrázek 10. TLC alkaloidního extraktu *Chlidanthus fragrans*

Zóna 1 byla promyta a přečištěna. Separovaný silikagel s adsorbovaným alkaloidem byl promýván chloroformem a následně směsí chloroformu s ethanolem (EtOH : CHCl<sub>3</sub> 1 : 1). Pomocí vakuové odparky bylo provedeno odpaření rozpouštědla do sucha a získané krystaly byly podrobeny strukturní analýze (GC-MS, NMR). Hmotnost získaných krystalů byla 30 mg. Získaná látka ale nebyla zcela čistá a prozatím nebyla dále zpracovávána.

Všechny další zóny byly zpracovávány stejným způsobem. Na základě strukturní analýzy byly zjištěny nečistoty v zónách 2 a 3, které byly dále odstraněny za pomoci malé sloupcové chromatografie na Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>(3g). Ze zóny se 2 se podařilo izolovat 8 mg čisté látky a ze zóny 3 28 mg čisté látky.

TLC analýza naznačovala, že zóna 4 také obsahuje více látek. Pro rozdělení této zóny byly použity desky s adsorbentem A2. Nakonec se nepodařilo od sebe oddělit jednotlivé frakce, i přesto že bylo vyzkoušeno více vyvíjecích soustav (S3, S4, S5). V soustavě S2 po čtyřnásobném vyvíjení došlo k nepatrnému oddělení dvou frakcí, které byly izolovány stejným způsobem, jako zóny z alkaloidního extraktu, nicméně následná strukturní analýza ukázala, že obě izolované frakce obsahují stejnou látku, a proto byly opět spojeny a označeny jako zóna 4, ze které bylo izolováno 35 mg látky.

Vzorky získané z obou vedlejších zón (1,2 a 3,4) byly uloženy pro případné další zpracování.

Všechny izolované látky v čistém stavu byly následně podrobeny strukturní analýze za účelem jejich identifikace.

### **4.3.5 Strukturní analýza izolovaných alkaloidů**

#### **4.3.5.1 EI-MS analýza**

EI-MS analýza byla prováděna na přístroji Agilent 7890 GC/MSD 5975 v režimu EI 70 eV. K měření byla použita kolona typu DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25  $\mu$ m, Agilent Technologies, USA). V průběhu měření se teplota měnila následovně: 100-180°C s nárůstem 15°C/min, poté 1 min při 180°C, následně 180–300°C s nárůstem 5°C/min a po dobu 5 min při 300°C. Škála detekce  $m/z$  40-600. Teplota při nanesení vzorku byla 280°C. Průtok helia použitého jako nosný plyn byl 0,8 ml/min<sup>4</sup>.

#### **4.3.5.2 NMR analýza**

NMR spektra byla měřena na spektrofotometru VNMR S500 NMR. Měření probíhalo za laboratorní teploty. Pro měření <sup>1</sup>H spektra byla použita frekvence 500 MHz a pro měření <sup>13</sup>C spektra frekvence 125 MHz. Jednotlivé chemické posuny byly zaznamenávány jako  $\delta$  hodnoty v pars per milion (ppm). Pro <sup>1</sup>H spektra jsou tyto posuny vztaženy k vnitřnímu standardu (tetramethylsilan; 7,26 ppm) a pro <sup>13</sup>C spektra jsou vztaženy k solventu (77,0 ppm)<sup>4</sup>.

NMR studie byly prováděny na Katedře anorganické a organické chemie, Farmaceutické fakulty v Hradci Králové. Měření a interpretaci spekter prováděl doc. PharmDr. Jiří Kuneš, Ph.D. a Mgr. Zdeněk Novák, Ph.D.

### **4.3.6 Stanovení inhibiční aktivity izolovaných alkaloidů vůči erytrocytární AChE a sérové BuChE**

Toto měření bylo prováděno na Katedře farmaceutické botaniky a ekologie, Farmaceutické fakulty v Hradci Králové. Měření prováděl prof. RNDr. Lubomír Opletal, CSc. Podrobný popis této metody je možno nalézt v následující literatuře (Cahlíková et al., 2011)<sup>62</sup>.

#### **4.3.7 Stanovení inhibiční aktivity izolovaných alkaloidů vůči POP**

Inhibiční aktivita vůči prolyl oligopeptidase byla měřena ve spolupráci s Centrem pokročilých studií, Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity obrany Hradec Králové. Měření prováděla Mgr. Martina Hrabínová. Podrobný popis metody měření je možné nalézt v následující literatuře (Cahlíková et al., 2015)<sup>79</sup>.

#### **4.3.8 Stanovení cytotoxické aktivity izolovaných alkaloidů**

Stanovení cytotoxické aktivity probíhalo ve spolupráci s Katedrou mikrobiologie, výživy a dietetiky, Fakulty agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů České zemědělské univerzity v Praze. Měření prováděl Ing. Ivo Doskočil. Podrobný popis metody je možno nalézt v následující literatuře (Doskočil et al., 2015)<sup>43</sup>.

## 5 Výsledky

V rámci této diplomové práce byly dále zpracovávány izolované alkaloidy ze zóny 2, zóny 3 a zóny 4, které byly identifikovány jako 6 $\alpha$ -hydroxybufanidrin, krinamidin a krinin.

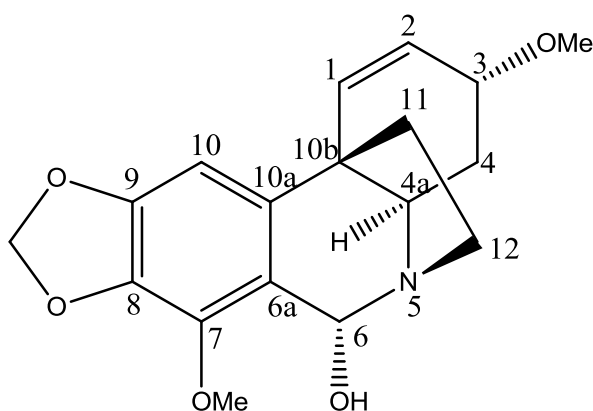
### 5.1 Strukturní analýza 6 $\alpha$ -hydroxybufanidrinu

Na základě strukturní analýzy (NMR, EI-MS) a porovnání získaných dat s literaturou byla látka izolovaná ze zóny 2 identifikována jako 6 $\alpha$ -hydroxybufanidrin<sup>80</sup>.

#### 5.1.1 EI-MS analýza

EI-MS 70 eV,  $m/z$  (rel. int.): 331[M]<sup>+</sup> (54), 299 (22), 287 (49), 276 (100), 261 (37), 255 (37), 243 (20), 217 (34), 203 (20), 128 (23), 115 (38), 91 (21), 77 (36), 63 (22), 56 (75).

#### 5.1.2 NMR analýza



Obrázek 11. Strukturní vzorec 6 $\alpha$ -hydroxybufanidrinu

##### 5.1.2.1 Popis <sup>1</sup>H NMR spektra 6 $\alpha$ -hydroxybufanidrinu

<sup>1</sup>H NMR (499.9 MHz;  $\delta$ , CDCl<sub>3</sub>, 25°C)

1.54 (1H, *dd*,  $J_{1,2} = 14.0$  Hz,  $J_{2,3} = 13.5$  Hz; H-4 $\beta$ ), 1.84 (1H, *dd*,  $J_{1,2} = 12.5$  Hz,  $J_{2,3} = 10.5$  Hz; H-11 *exo*), 1.90 (1H, *dd*,  $J_{1,2} = 12.5$  Hz,  $J_{2,3} = 9.0$  Hz; H-11 *endo*), 2.08 (1H, *dd*,  $J_{1,2} = 14.0$  Hz,  $J_{2,3} = 4.0$  Hz; H-4 $\alpha$ ), 2.79 (1H, *dd*,  $J_{1,2} = 13.0$  Hz,  $J_{2,3} = 9.0$  Hz; H-12 *endo*), 3.31 (1H, *dd*,  $J_{1,2} = 13.0$  Hz,  $J_{2,3} = 10.5$  Hz; H-12 *exo*), 3.32 (3H, *s*, 3-OMe), 3.79 (1H,

*dd*,  $J_{1,2} = 5.0$  Hz,  $J_{2,3} = 4.0$  Hz; H-3), 3.84 (1H, *dd*,  $J_{1,2} = 13.5$  Hz,  $J_{2,3} = 4.0$  Hz; H-4a), 4.01 (3H, *s*, 7-OMe), 5.84-5.87 (2H, *s*, -O-CH<sub>2</sub>-O-), 5.94 (1H, *dd*,  $J_{1,2} = 10.0$  Hz,  $J_{2,3} = 5.0$  Hz; H-2), 6.52 (1H, *d*,  $J_{1,2} = 10.0$  Hz; H-1), 6.55 (1H, *s*, H-10).

#### 5.1.2.2 Popis <sup>13</sup>C NMR spektra 6α-hydroxybufanidrinu

<sup>13</sup>C NMR (125,7 MHz, δ, CDCl<sub>3</sub>, 25°C)

149.3 (*s*, C-9), 142.5 (*s*, C-7), 139.8 (*s*, C-10a), 134.2 (*s*, C-8), 131.9 (*d*, C-1), 125.8 (*d*, C-2), 119.2 (*s*, C-6a), 100.8 (*t*, -O-CH<sub>2</sub>-O-), 97.0 (*d*, C-10), 85.6 (*d*, C-6β), 72.3 (*d*, C-3), 59.8 (*q*, 7-OMe), 56.4 (*d*, C-4a), 56.3 (*q*, 3-OMe), 47.7 (*t*, C-12 *exo*), 47.7 (*t*, C-12 *endo*), 44.2 (*s*, C-10b), 40.8 (*t*, C-11 *exo*), 40.8 (*t*, C-11 *endo*), 27.9 (*t*, 4α), 27.9 (*t*, 4β).

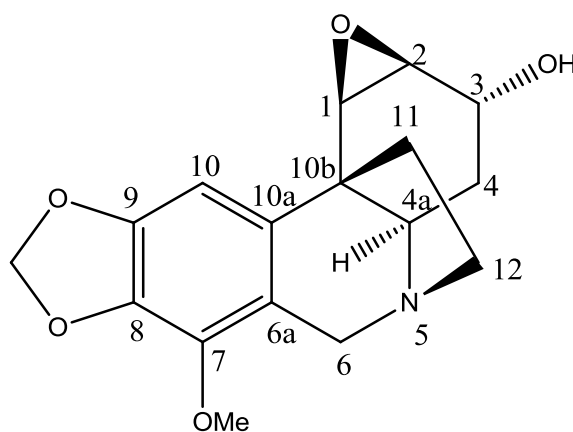
## 5.2 Strukturní analýza krinamidinu

Na základě strukturní analýzy (NMR, EI-MS) a porovnání získaných dat s literaturou byla látka izolovaná ze zóny 3 identifikována jako krinamidin<sup>81</sup>.

### 5.2.1 EI-MS analýza

EI-MS 70 eV, *m/z* (rel. int.): 317 [M]<sup>+</sup> (37), 288 (100), 258 (18), 245 (31), 244 (25), 217 (32), 205 (31), 204 (21), 203 (32), 189 (19), 173 (38), 115 (17), 85 (19), 57 (21), 56 (31).

### 5.2.2 NMR analýza



Obrázek 12. Strukturní vzorec krinamidinu

### 5.2.2.1 Popis $^1\text{H}$ NMR spektra krinamidinu

$^1\text{H}$  NMR (499.9 MHz;  $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ , 25°C)

1.56 (1H, *dd*,  $J_{1,2} = 13.5$  Hz,  $J_{2,3} = 12.5$  Hz; H-4 $\beta$ ), 1.61 (1H, *dd*,  $J_{1,2} = 13.5$  Hz,  $J_{2,3} = 5.5$  Hz; H-4 $\alpha$ ), 2.0 (1H, *dd*,  $J_{1,2} = 12.5$  Hz,  $J_{2,3} = 9.0$  Hz; H-11 *endo*), 2.37 (1H, *dd*,  $J_{1,2} = 12.5$  Hz,  $J_{2,3} = 10.5$  Hz; H-11 *exo*), 2.77 (1H, *dd*,  $J_{1,2} = 12.5$  Hz,  $J_{2,3} = 9.0$  Hz; H-12 *endo*), 3.17 (1H, *dd*,  $J_{1,2} = 12.5$  Hz,  $J_{2,3} = 10.5$  Hz; H-12 *exo*), 3.17 (1H, *dd*,  $J_{1,2} = 12.5$  Hz,  $J_{2,3} = 5.5$  Hz; H-4 $\alpha$ ), 3.26 (1H, *dd*,  $J_{1,2} = 4.0$  Hz,  $J_{2,3} = 2.5$  Hz; H-2), 3.71 (1H, *d*,  $J = 17.5$  Hz; H-6 $\beta$ ), 3.75 (1H, *d*,  $J = 4.0$  Hz; H-1), 3.95 (3H, *s*, 7-OMe), 4.19 (1H, *d*,  $J = 17.5$  Hz; H-6 $\alpha$ ), 4.48 (1H, *dd*,  $J_{1,2} = 3.0$  Hz,  $J_{2,3} = 2.5$  Hz; H-3), 5.85-5.86 (2H, *s*,  $J = 1.5$  Hz; -O-CH<sub>2</sub>-O-), 6.61 (1H, *s*, H-10).

### 5.2.2.2 Popis $^{13}\text{C}$ NMR spektra krinamidinu

$^{13}\text{C}$  NMR (125,7 MHz,  $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ , 25°C)

148.1 (*s*, C-9), 141.1 (*s*, C-7), 138.7 (*s*, C-10a), 133.4 (*s*, C-8), 117.6 (*s*, C-6a), 100.7 (*t*, -O-CH<sub>2</sub>-O-), 96.4 (*d*, C-10), 65.5 (*d*, C-3), 61.0 (*d*, C-4a), 59.1 (*q*, 7-OMe), 58.6 (*t*, C-6), 56.4 (*d*, C-2), 53.8 (*d*, C-1), 52.5 (*t*, C-12), 41.6 (*s*, C-10b), 39.2 (*t*, C-11), 29.7 (*t*, C-4).

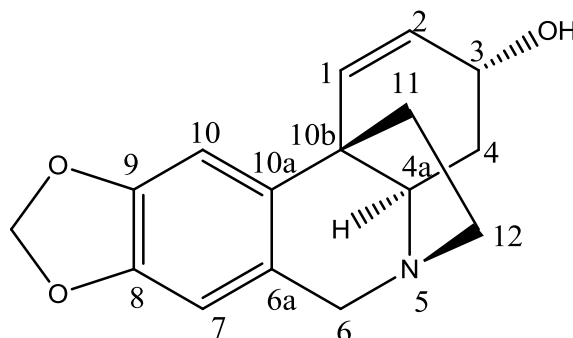
## 5.3 Strukturní analýza krininu

Na základě strukturní analýzy (NMR, EI-MS) a porovnání získaných dat s literaturou byla látka izolovaná ze zóny 4 identifikována jako krinin<sup>82</sup>.

### 5.3.1 EI-MS analýza

EI-MS 70 eV,  $m/z$  (rel. int.): 271[M]<sup>+</sup> (100), 270 (7), 254 (6), 242 (7), 228 (17), 216 (5), 200 (11), 199 (32), 187 (20), 173 (7), 172 (6), 129 (6), 115 (5), 57 (9), 56 (11).

### 5.3.2 NMR analýza



Obrázek 13. Strukturní vzorec krininu

#### 5.3.2.1 Popis $^1\text{H}$ NMR spektra krininu

$^1\text{H}$  NMR (300,0 MHz;  $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ , 25°C)

1.74 (1H, *dd*,  $J_{1,2} = 4,2$  Hz,  $J_{2,3} = 13,5$  Hz; H-4 $\beta$ ), 1.94 (1H, *dd*,  $J_{1,2} = 6,3$  Hz,  $J_{2,3} = 10,8$  Hz; H-11 *exo*), 2.06 (1H, *brd*,  $J = 13,5$  Hz; H-4 $\alpha$ ), 2.19 (1H, *dd*,  $J_{1,2} = 3,9$  Hz,  $J_{2,3} = 8,7$  Hz; H-11 *endo*), 2.91 (1H, *dd*,  $J_{1,2} = 6,3$  Hz,  $J_{2,3} = 8,7$  Hz; H-12 *endo*), 3.36 (1H, *brd*,  $J = 12,8$  Hz; H-12 *exo*), 3.42 (1H, *dd*,  $J_{1,2} = 3,9$  Hz,  $J_{2,3} = 13,5$  Hz; H-4 $\alpha$ ), 3.78 (1H, *d*,  $J = 16,8$  Hz; H-6 $\beta$ ), 4.33 (1H, *m*, H-3), 4.41 (1H, *d*,  $J = 16,8$  Hz; H-6 $\alpha$ ), 5.89-5.91 (2H, *2d*,  $J = 1,2$  Hz; -O-CH<sub>2</sub>-O-), 5.96 (1H, *dd*,  $J_{1,2} = 5,4$  Hz,  $J_{2,3} = 10,0$  Hz; H-2), 6.48 (1H, *s*, H-7), 6.59 (1H, *d*,  $J = 10,0$  Hz; H-1), 6.85 (1H, *s*, H-10).

#### 5.3.2.2 Popis $^{13}\text{C}$ NMR spektra krininu

$^{13}\text{C}$  NMR (50,0 MHz,  $\delta$ ,  $\text{CDCl}_3$ , 25°C)

146.3 (*s*, C-9), 145.8 (*s*, C-8), 137.8 (*s*, C-10a), 131.0 (*d*, C-1), 128.0 (*d*, C-2), 125.0 (*s*, C-6a), 106.9 (*d*, C-7), 102.9 (*d*, C-10), 100.8 (*t*, -O-CH<sub>2</sub>-O-), 63.3 (*d*, C-3), 62.9 (*d*, C-4a), 61.5 (*t*, C-6), 53.1 (*t*, C-12), 44.3 (*s*, C-10b), 43.6 (*t*, C-11), 32.3 (*t*, C-4).



## 5.4 Inhibiční aktivita izolovaných alkaloidů vůči erytrocytární AChE a sérové BuChE

U jednotlivých alkaloidů byla testována jejich schopnost inhibovat erytrocytární acetylcholinesterasu a sérovou butyrylcholinesterasu. Výsledky testů jsou shrnuty v následující tabulce.

Tabulka 9. Inhibiční aktivita izolovaných alkaloidů vůči AChE a BuChE

Alkaloid	IC <sub>50</sub> , AChE (μM)	IC <sub>50</sub> , BuChE (μM)
6α-hydroxybufanidrin	-	-
krinamidin	220,88 ± 22,17	>1000
krinin	>1000	770,01 ± 46,94
galanthamin <sup>a</sup>	6,90 ± 0,30	156,00 ± 6,90
huperzin A <sup>a</sup>	0,25 ± 0,01	>1000

"-" = nebylo testováno, <sup>a</sup>Referenční látka

## 5.5 Inhibiční aktivita izolovaných alkaloidů vůči POP

U získaných alkaloidů byla testována jejich schopnost inhibovat prolyl oligopeptidasu. Naměřené hodnoty shrnuje následující tabulka.

Tabulka 10. Inhibiční aktivita izolovaných alkaloidů vůči POP

Alkaloid	IC <sub>50</sub> , POP (mM)
6α-hydroxybufanidrin	-
krinamidin	0,790 ± 0,062
krinin	1,473 ± 0,122
berberin <sup>a</sup>	0,142 ± 0,022
Z-prolyl-prolinal <sup>a</sup>	2,750 x 10 <sup>-6</sup>

"-" = nebylo testováno, <sup>a</sup>Referenční látka

## 5.6 Cytotoxická aktivita izolovaných alkaloidů

Izolované alkaloidy byly podrobeny testování na cytotoxickou aktivitu vůči nádorovým buňkám i zdravému fibroblastu. Výsledky jsou shrnuty v následující tabulce.

Tabulka 11. Cytotoxická aktivita izolovaných alkaloidů

Alkaloid	Buněčná linie, IC <sub>50</sub> (μM)		
	Caco-2	HT-29	FHS-74int
6α-hydroxybufanidrin	-	-	-
krinamidin	*	*	*
krinin	64,54 ± 17,78	50,84 ± 1,42	>100
hydratovaný vinorelbin-ditartrát <sup>a</sup>	0,03 ± 0,00	-	3,98 ± 0,26

"-" = nebylo testováno, <sup>a</sup>Referenční látka, "\*" = probíhá testování

## 6 Diskuse a závěr

Předmětem této diplomové práce bylo zpracování poslední frakce (frakce č. 7) alkaloidního extraktu z rostliny *Chlidanthus fragrans*. Na základě GC-MS analýzy byly v této frakci identifikovány alkaloidy, které prozatím na katedře nebyly izolovány. Frakce byla zpracována pomocí preparativní tenkovrstvé chromatografie. Podařilo se izolovat celkem 3 alkaloidy čeledi Amaryllidaceae v čistém stavu, konkrétně krinin, krinamidin a 6 $\alpha$ -hydroxybufanidrin. Izolované alkaloidy byly identifikovány na základě MS a také 1D- a 2D-NMR analýz a porovnáním získaných dat s literaturou. Všechny sloučeniny můžeme zařadit do krininového strukturního typu a již dříve byly izolovány z různých rostlin čeledi Amaryllidaceae. Z rostliny *Chlidanthus fragrans* byly všechny jmenované alkaloidy izolovány poprvé. Krinin patří mezi nejběžnější alkaloidy této skupiny a byl získán například z cibulí *Brunsvigia josephinae*<sup>82</sup>, *Crinum latifolium*, *Crinum bulbispermum*<sup>83</sup>, *Ammocharis tinneana*<sup>32</sup> a celé řady dalších. Krinamidin patří mezi méně se vyskytující Amaryllidaceae alkaloidy a prozatím byl izolován např. z *Crinum bulbispermum*<sup>83</sup> a *Brunsvigia orientalis*<sup>81</sup>. Oba tyto alkaloidy byly izolovány v množství dovolujícím provedení více biologických studií. Poslední alkaloid 6 $\alpha$ -hydroxybufanidrin byl ale bohužel získán v množství, které umožnilo pouze strukturní analýzu. Jedná se o látku vyskytující se v přírodě v omezeném množství. Prozatím byl izolován z cibulí *Nerine filifolia*<sup>80</sup> a dále z *Crinum zeylanicum*<sup>84</sup>.

Alkaloidy krinin a krinamidin byly v rámci biologických testů studovány z pohledu jejich inhibiční aktivity vůči erytrocytární AChE a sérové BuChE, POP a dále byla sledována jejich protinádorová aktivita na panelu dvou p53-negativních nádorových liniích Caco-2 a HT-29. Zároveň byla studována jejich celková toxicita na buňkách zdravého fibroblastu FHS-74int.

V testu na stanovení inhibiční aktivity vůči AChE a BuChE byly jako standardy použity galanthamin a huperzin A. Obě studované látky vykazaly v tomto testu vysoké hodnoty IC<sub>50</sub> a nejeví se tedy jako perspektivní pro další studie.

Kromě inhibice AChE a BuChE se v dnešní době jako další zajímavý terapeutický cíl ukazuje inhibice cytosolové serinové peptidasy POP, která, jak již bylo zmíněno dříve, může hrát roli v procesech neurodegenerativních onemocněních a v rozvoji poruch kognitivních funkcí<sup>4</sup>. Některé inhibitory POP už se navíc ukázaly jako efektivní v terapii demencí. Látky schopné inhibovat tuto peptidasu by mohly být využívány jako podpůrná léčiva v terapii AD<sup>85</sup>. Inhibice POP byla testována ve spolupráci s Centrem pokročilých

studií, Fakulty vojenského zdravotnictví Univerzity obrany Hradec Králové. Bohužel ani u jedné z testovaných látek nebyla zjištěna významnější inhibiční aktivita vůči POP a ani v této oblasti tedy nejsou zajímavé pro další studium.

Alkaloidy čeledi Amaryllidaceae se vyznačují také významnou protinádorovou aktivitou. Z tohoto důvodu byla testována i cytotoxicita izolovaných látek za využití MTT testu, kde byl jako standard použit hydratovaný vinorelbin-ditartrát<sup>43</sup>. Toto měření probíhalo ve spolupráci s Katedrou mikrobiologie, výživy a dietetiky, Fakulty agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů České zemědělské univerzity v Praze. Vzhledem k časové náročnosti těchto testů jsme prozatím obdrželi výsledky pouze pro krinin, u krinamidinu v současné době testování probíhá. Cytotoxická aktivita krininu vůči studovaným nádorovým liniím je pouze mírná ( $IC_{50,Caco-2} = 4,54 \pm 17,78 \mu M$  a  $IC_{50,HT-29} = 50,84 \pm 1,42 \mu M$ ) a vůči buňkám zdravého fibroblastu je tato látka netoxická. Selektivní toxicita Amaryllidaceae alkaloidů vůči nádorovým buňkám je v literatuře popsána a z tohoto důvodu jsou tyto látky v poslední době intenzivně studovány<sup>43</sup>. Krinin jako látka široce se vyskytující v Amaryllidaceae rostlinách by mohl sloužit pro přípravu polosyntetických derivátů za účelem zlepšení jeho protinádorové aktivity.

Závěrem je možné říci, že na základě výsledků získaných v rámci této diplomové práce a předchozích studií<sup>43,62,78</sup> je rostlina *Chlidanthus fragrans* zajímavým zdrojem Amaryllidaceae alkaloidů, z nichž některé se vyznačují zajímavou biologickou aktivitou.

## 7 Použitá literatura

1. Murphy Cowan M. (1999) Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews*, **12**, 564-582.
2. Jahodář L. *Farmakobotanika: semenné rostliny*. Vyd. 1. Praha: Karolinum, 2006. ISBN 8024612259.
3. <http://www.britannica.com> staženo 19. 3. 2016.
4. Cahlíková L, Hrabínová M, Kulhánková A, Benešová N, Chlebek J, Jun D, Novák Z, Macáková K, Kuneš J, Kuča K, Opletal L. (2013) Alkaloids from *Chlidanthus fragrans* and their acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and prolyl oligopeptidase activities. *Natural Product Communications*, **8**, 1541-1544.
5. Evidente A, Kornienko A. (2009) Anticancer evaluation of structurally diverse Amaryllidaceae alkaloids and their synthetic derivatives. *Phytochemistry Reviews*, **8**, 449-459.
6. Unver N. (2007) New skeletons and new concepts in Amaryllidaceae alkaloids. *Phytochemistry Reviews*, **6**, 125-135.
7. Dalecká M, Havelek R, Královec K, Brůčková L, Cahlíková L. (2013) Alkaloidy rostlin čeledi Amaryllidaceae jako potenciální léčiva v terapii nádorových onemocnění. *Chemické Listy*, **107**, 701-708.
8. Chase MW. (2009) An update of the angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **161**, 105-121.
9. <http://pacificbulbsociety.org> staženo 18. 3. 2016
10. Boit HG. (1956) Alkaloide von *Chlidanthus fragrans*, *Vallota purpurea*, *Nerine undulata* und *Hippeastrum vittatum* (XI. Mitteil. über Amaryllidaceen-Alkaloide). *Chemische Berichte*, **89**, 1129-1134.
11. Hanks GR. *Narcissus and Daffodil: the genus Narcissus*. Londýn: CRC Press, 2002. ISBN 0415273447.
12. Berkov S, Martínez-Francés V, Bastida J, Codina C, Ríos S. (2014) Evolution of alkaloid biosynthesis in the genus *Narcissus*. *Phytochemistry*, **99**, 95-106.
13. Polya G. *Biochemical targets of plant bioactive compounds: a pharmacological reference guide to sites of action and biological effects*. USA: CRC Press, 2003. ISBN 0203013719.
14. Singh A, Desgagné-Penix I. (2014) Biosynthesis of the Amaryllidaceae alkaloids. *Plant Science Today*, **1**, 114-120.

15. Takos AM, Rook F. (2013) Towards a molecular understanding of the biosynthesis of Amaryllidaceae alkaloids in support of their expanding medical use. *International Journal of Molecular Sciences*, **14**, 11713-11741.
16. <http://www.ausgardener.com.au> staženo 18. 3. 2016
17. Kilgore MB, Kutchan MT. (2015) The Amaryllidaceae alkaloids: biosynthesis and methods for enzyme discovery. *Phytochemistry Reviews*,
18. Bastida J, Berkov S, Torras L, Belén Pigni N, Andrade de JP, Martínez V, Codina C, Viladomat F. (2011) Chemical and biological aspects of Amaryllidaceae alkaloids. *Recent Advances in Pharmaceutical Sciences*, 65-100.
19. Lamoral-Theys D, Andolfi A, Van Goietsenoven G, Cimmino A, Le Calvé B, Wauthoz N, Mégalizzi V, Gras T, Bruyère C, Dubois J, Mathieu V, Kornienko A, Kiss R, Evidente A. (2009) Lycorine, the main phenanthridine Amaryllidaceae alkaloid, exhibits significant antitumor activity in cancer cells that display resistance to proapoptotic stimuli: an investigation of structure-activity relationship and mechanistic insight. *Journal of Medicinal Chemistry*, **52**, 6244-6256.
20. Evidente A, Kireev AS, Jenkins AR, Romero AE, Steelant WFA, Van Slambrouck S, Kornienko A. (2009) Biological evaluation of structurally diverse Amaryllidaceae alkaloids and their synthetic derivatives: discovery of novel leads for anticancer drug design. *Planta Medica*, **75**, 501-507.
21. Refaat J, Kamel SM, Ramadan AM, Ali AA. (2012) *Crinum*; an endless source of bioactive principles: A review. Part 1 - Crinum alkaloids: lycorine-type alkaloids. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, **3**, 1883-1890.
22. Kintsurashvili L, Vachnadze V. (2007) Plants of the Amaryllidaceae family grown and introduced in Georgia: a source of galanthamine. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, **41**, 38-40.
23. Herrera MR, Machocho AK, Brun R, Viladomat F, Codina C, Bastida J. (2001) Crinane and lycorane type alkaloids from *Zephyranthes citrina*. *Planta Medica*, **67**, 191-193.
24. Toriizuka Y, Kinoshita E, Kogure N, Kitajima M, Ishiyama A, Otoguro K, Yamada H, Omura S, Takayama H. (2008) New lycorine-type alkaloid from *Lycoris traubii* and evaluation of antitrypanosomal and antimalarial activities of lycorine derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **16**, 10182-10189.
25. Jin Z, Xu X. (2013) Amaryllidaceae Alkaloids. Ramawat KG, Mérillon JM. *Natural products: phytochemistry, botany and metabolism of alkaloids, phenolics and terpenes*. Springer Berlin Heidelberg, 479-522.
26. Berkov S, Bastida J, Sidjimova B, Viladomat F, Codina C. (2011) Alkaloid diversity in *Galanthus elwesii* and *Galanthus nivalis*. *Chemistry & Biodiversity*, **8**, 115-130.

27. Refaat J, Kamel SM, Ramadan AM, Ali AA. (2012) *Crinum*; an endless source of bioactive principles: A review. Part III - Crinum alkaloids: belladine-, galanthamine-, lycorenine-, tazettine-type alkaloids and other minor types. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, **3**, 3630-3638.
28. Giordani RB, Andrade de JP, Verli H, Dutilh JH, Henriques AT, Berkov S, Bastida J, Zuanazzi JAS. (2011) Alkaloids from *Hippeastrum morelianum* Lem. (Amaryllidaceae). *Magnetic Resonance in Chemistry*, **49**, 668-672.
29. Refaat J, Kamel SM, Ramadan AM, Ali AA. (2012) *Crinum*; an endless source of bioactive principles: A review. Part II - Crinum alkaloids: Crinine-type alkaloids. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, **3**, 3091-3100.
30. Bozkurt-Sarikaya B, Kaya GI, Onur MA, Bastida J, Berkov S, Unver-Somer N. (2014) GC/MS analysis of Amaryllidaceae alkaloids in *Galanthus gracilis*. *Chemistry of Natural Compounds*, **50**, 573-575.
31. Andrade de JP, Guo Y, Font-Bardia M, Calvet T, Dutilh J, Viladomat F, Codina C, Nair JJ, Zuanazzi JAS, Bastida J. (2014) Crinine-type alkaloids from *Hippeastrum aulicum* and *H. calyptratum*. *Phytochemistry*, **103**, 188-195.
32. Machocho A, Chhabra SC, Viladomat F, Codina C, Bastida J. (1999) Alkaloids from *Ammocharis tinneana*. *Phytochemistry*, **51**, 1185-1191.
33. Linden A, Akineri G, Noyan S, Gözler T, Hesse M. (1998) Amaryllidaceae alkaloids: (+)-Tazettine, (+)-3-*O*-Demethylcriwelline and (+)-3-Epimacronine at 173 K. *Acta Crystallographica Section C Crystal Structure Communications*, **54**, 1653-1659.
34. Latvala A, Onur MA, Gozler T, Linden A, Kivcak B, Hesse M. (1995) Alkaloids of *Galanthus elwesii*. *Phytochemistry*, **39**, 1229-1240.
35. Wildman WC, Bailey DT. (1967) Pretazettine. *Journal of American Chemical Society*, **89**, 5514-5515.
36. Alkaloids. *Natural compounds: plant sources, structure and properties*. New York: Springer, 2013. ISBN 9781461405405.
37. Kornienko A, Evidente A. (2008) Chemistry, biology and medicinal potential of narciclasine and its congeners. *Chemical Reviews*, **108**, 1982–2014.
38. Hu Y, Na X, Li J, Yang L, You J, Liang X, Wang J, Peng L, Bi Y. (2015) Narciclasine, a potential allelochemical, affects subcellular trafficking of auxin transporter proteins and actin cytoskeleton dynamics in *Arabidopsis* roots. *Planta*, **242**, 1349-1360.
39. Cedrón JC, Estévez-Braun A, Ravelo AG, Gutiérrez D, Flores N, Bucio MA, Pérez-Hernández N, Joseph-Nathan P. (2009) Bioactive montanine derivatives from halide-induced rearrangements of haemanthamine-type alkaloids. Absolute configuration by VCD. *Organic Letters*, **11**, 1491-1494.

40. Bao X, Cao Y, Chu W, Qu H, Du J, Zhao X, Ma X, Wang Ch, Fan Ch. (2013) Bioinspired total synthesis of montanine-type Amaryllidaceae alkaloids. *Angewandte Chemie*, **52**, 14167-14172.
41. Berkov S, Georgieva L, Kondakova V, Atanassov A, Viladomat F, Bastida J, Codina C. (2009) Plant sources of galanthamine: Phytochemical and biotechnological aspects. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, **23**, 1170-1176.
42. Cherkasov OA. (1977) Plant sources of galanthamine. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, **11**, 810-813.
43. Doskočil I, Hošťálková A, Šafratová M, Benešová N, Havlík J, Havelík R, Kuneš J, Královec K, Chlebek J, Cahlíková L. (2015) Cytotoxic activities of Amaryllidaceae alkaloids against gastrointestinal cancer cells. *Phytochemistry Letters*, **13**, 394-398.
44. Cedrón JC, Ravelo AG, León LG, Padrón JM, Estévez-Braun A. (2015) Antiproliferative and structure activity relationships of Amaryllidaceae alkaloids. *Molecules*, **20**, 13854-13863.
45. Zupko I, Rethy B, Hohmann J, Molnár J, Ocsóvszki I, Falkay G. (2009) Antitumor activity of alkaloids derived from Amaryllidaceae species. *In Vivo*, **23**, 41-48.
46. Van Goietsenoven G, Andolfi A, Lallemand B, Cimmino A, Lamoral-Theys D, Gras T, Abou-Donia A, Dubois J, Lefranc F, Mathieu V, Kornienko A, Kiss R, Evidente A. (2010) Amaryllidaceae alkaloids belonging to different structural subgroups display activity against apoptosis-resistant cancer cells. *Journal of Natural Products*, **73**, 1223-1227.
47. He M, Qu Ch, Gao O, Hu X, Hong X. (2015) Biological and pharmacological activities of Amaryllidaceae alkaloids. *Royal Society of Chemistry*, **5**, 16562-16574.
48. [www.cheminfo.chemi.muni.cz](http://www.cheminfo.chemi.muni.cz) staženo 30. 3. 2016
49. Dumont P, Ingrassia L, Rouzeau S, Ribaucour F, Thomas S, Roland I, Darro F, Lefranc F, Kiss R. (2007) The Amaryllidaceae isocarbostryl narciclasine induces apoptosis by activation of the death receptor and/or mitochondrial pathways in cancer cells but not in normal fibroblasts. *Neoplasia*, **9**, 766-776.
50. Ingrassia L, Lefranc F, Dewelle J, Pottier L, Mathieu V, Spiegl-Kreinecker S, Sauvage S, El Yazidi M, Dehoux M, Berger W, Van Quaquebeke E, Kiss R. (2009) Structure–activity relationship analysis of novel derivatives of narciclasine (an Amaryllidaceae isocarbostryl derivative) as potential anticancer agents. *Journal of Medicinal Chemistry*, **52**, 1100-1114.
51. Griffin C, Sharda N, Sood N, Nair J, McNulty J, Pandey S. (2007) Selective cytotoxicity of pancratistatin-related natural Amaryllidaceae alkaloids: evaluation of the activity of two new compounds. *Cancer Cell International*, **7**.
52. Griffin C, Hamm C, McNulty J, Pandey S. (2010) Pancratistatin induces apoptosis in clinical leukemia samples with minimal effect on non-cancerous peripheral blood mononuclear cells. *Cancer Cell International*, **10**.



53. Griffin C, Karnik A, McNulty J, Pandey S. (2011) Pancratistatin selectively targets cancer cell mitochondria and reduces growth of human colon tumor xenografts. *Molecular Cancer Therapeutics*, **10**, 57-68.
54. Havelek R, Seifrtova M, Kralovec K, Bruckova L, Cahliková L, Dalecká M, Vávrová J, Řezáčová M, Opletal L, Bílková Z. (2014) The effect of Amaryllidaceae alkaloids haemanthamine and haemanthidine on cell cycle progression and apoptosis in p53-negative human leukemic Jurkat cells. *Phytomedicine*, **21**, 479-490.
55. Raboch J, Pavlovský P, a kolektiv. *Psychiatrie*. Vyd. 1. Praha: Karolinum, 2012. ISBN 8024619857.
56. Kračmarová A, Drtinová L, Pohanka M. (2015) Possibility of acetylcholinesterase overexpression in Alzheimer disease patients after therapy with acetylcholinesterase inhibitors. *Acta Medica (Hradec Králové)*, **58**, 37-42.
57. Anand P, Singh B. (2013) A review on cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease. *Archives of Pharmacal Research*, **36**, 375-399.
58. Jin Z. (2013) Amaryllidaceae and Sceletium alkaloids. *Natural Product Reports*, **30**, 849-868.
59. Cahliková L, Benešová N, Macáková K, Kučera R, Hrstka V, Klimeš J, Jahodář L, Opletal L. (2012) Alkaloids from some Amaryllidaceae species and their cholinesterase activity. *Natural product communications*, **7**, 571-574.
60. Zvolský P. (2001) Demence. *Interní medicína pro praxi*, **11**, 15-19.
61. Godyń J, Jończyk J, Panek D, Malawska B. (2016) Therapeutic strategies for Alzheimer's disease in clinical trials. *Pharmacological Reports*, **68**, 127-138.
62. Cahliková L, Macáková K, Zavadil S, Jiroš P, Opletal L, Urbanová K, Jahodář L. (2011) Analysis of Amaryllidaceae alkaloids from *Chlidanthus fragrans* by GC-MS and their cholinesterase activity. *Natural Product Communications*, **6**, 603-606.
63. Ceriotti G. (1967) Narciclasine: an antimitotic substance from narcissus bulbs. *Nature*, **213**, 595-596.
64. Nair JJ, Rárová L, Strnad M, Bastida J, Staden van J. (2012) Apoptosis-inducing effects of distichamine and narcipramine, rare alkaloids of the plant family Amaryllidaceae. *Bioorganic & Medicinal chemistry letters*, **22**, 6195-6199.
65. Nair JJ, Rárová L, Strnad M, Bastida J, Staden van J. (2013) Alkaloids from *Boophone haemanthoides* (Amaryllidaceae). *Natural product communications*, **8**, 1705-1710.
66. Russo P, Frustaci A, Del Bufalo A, Fini M, Cesario A. (2013) Multitarget drugs of plants origin acting on Alzheimer's disease. *Current medicinal chemistry*, **20**, 1686-1693.
67. Gulcan HO, Orhan IE, Sener B. (2015) Chemical and molecular aspects on interactions of galanthamine and its derivatives with cholinesterases. *Current pharmaceutical biotechnology*, **16**, 252-258.

68. Andrade de JP, Pigni NB, Torras-Claveira L, Guo Y, Berkov S, Reyes-Chilpa R, Amrani El A, Zuanazzu JAS, Codina C, Viladomat F, Bastida J. (2012) Alkaloids from the *Hippeastrum* genus: Chemistry and biological activity. *Revista Latinoamericana de Química*, **40**, 83-98.
69. Reyes-Chilpa R, Berkov S, Hernández-Ortega S, Jankowski ChK, Arseneau S, Clotet-Codina I, Esté JA, Codina C, Viladomat F, Bastida J. (2011) Acetylcholinesterase-inhibiting alkaloids from *Zephyranthes concolor*. *Molecules*, **16**, 9520-9533.
70. López S, Bastida J, Viladomat F, Codina C. (2002) Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and *Narcissus* extracts. *Life Sciences*, **71**, 2521-2529.
71. Cheesman L, Nair JJ, Staden van J. (2012) Antibacterial activity of crinane alkaloids from *Boophone disticha* (Amaryllidaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, **140**, 405-408.
72. Nkanwen ERS, Gatsing D, Ngamga D, Fodouop SPC, Tane P. (2009) Antibacterial agents from the leaves of *Crinum purpurascens* herb (Amaryllidaceae). *African health sciences*, **9**, 264-269.
73. Iannello C, Bastida J, Bonvicini F, Antognoni F, Gentilomi GA, Poli F. (2014) Chemical composition and *in vitro* antibacterial and antifungal activity of an alkaloid extract from *Crinum angustum* Steud. *Natural product research*, **28**, 704-710.
74. Cedrón CJ, Gutiérrez D, Flores N, Ravelo AG, Estévaz-Braun A. (2010) Synthesis and antiplasmodial activity of lycorine derivatives. *Bioorganic & Medicinal chemistry*, **18**, 4694-4701.
75. Sener B, Orhan I, Satayavivad J. (2003) Antimalarial activity screening of some alkaloids and plant extract from Amaryllidaceae. *Phytoterapy research*, **17**, 1220-1223.
76. Giordani RB, Celso OR Junior, Andrade de JP, Bastida J, Zuanazzi JAS, Tasca T, Almeida de AM. (2012) Lycorine derivatives against *Trichomonas vaginalis*. *Chemical Biology & Drug Design*, **80**, 129-133.
77. Silva de AFS, Andrade de JP, Bevilacqua LRM, Souza de MM, Izquiereo I, Henriques AT, Zuanazzi JAS. (2006) Anxiolytic-, antidepressant- and anticonvulsant-like effects of the alkaloid montanine isolated from *Hippeastrum vittatum*. *Pharmacology, biochemistry and behavior*, **85**, 148-154.
78. Cahlíková L, Pérez ID, Štěpánková Š, Chlebek J, Šafratová M, Hošťálková A, Opletal L. (2015) *In vitro* inhibitory effects of 8-O-demethylmaritidine and undulatine on acetylcholinesterase and their predicted penetration across the blood-brain barrier. *Journal of natural products*, **78**, 1189-1192.
79. Cahlíková L, Hulová L, Hrabínová M, Chlebek J, Hošťálková A, Adamcová M, Šafratová M, Jun D, Opletal L, Ločárek M, Macáková K. (2015) Isoquinoline alkaloids as prolyl oligopeptidase inhibitors. *Fitoterapia*, **103**, 192-196.

80. Nair JJ, Campbell WE, Brun R, Viladomat F, Codina C, Bastida J. (2005) Alkaloids from *Nerine filifolia*. *Phytochemistry*, **66**, 373-382.
81. Viladomat F, Almanza GR, Codina C, Bastida J, Campbell WE, Mathee S. (1996) Alkaloids from *Brunsvigia orientalis*. *Phytochemistry*, **43**, 1379-1384.
82. Viladomat F, Codina C, Bastida J, Mathee S, Campbell WE. (1995) Further alkaloids from *Brunsvigia josephinae*. *Phytochemistry*, **40**, 961-965.
83. Kobayashi S, Tokumoto T, Kihara M, Imakura Y, Shingu T, Taira Z. (1984) Alkaloidal constituents of *Crinum latifolium* and *Crinum bulbispermum* (Amaryllidaceae). *Chemical and pharmaceutical bulletin*, **32**, 3015-3022.
84. Berkov S, Romank S, Herrera M, Viladomat F, Momekov G, Ionkova I, Bastida J. (2011) Antiproliferative alkaloids from *Crinum zeylanicum*. *Phytotherapy research*, **25**, 1686-1692.
85. Toide K, Shinoda M, Fujiwara T, Iwamoto Y. (1997) Effect of a novel prolyl endopeptidase inhibitor, JTP-4819, on spatial memory and central cholinergic neurons in aged rats. *Pharmacology biochemistry and behavior*, **56**, 427-434.

## 8 Seznam zkratek

AD	Alzheimerova choroba
AChE	acetylcholinesterasa
APP	amyloidový prekurzorový protein
ATP	adenosintrifosfát
BuChE	butyrylcholinesterasa
Bz	benzoyl
CHCl <sub>3</sub>	chloroform
CH <sub>x</sub>	cyklohexan
CNS	centrální nervová soustava
DEA	diethylamin
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EI-MS	hmotnostní spektrometrie s elektronovou ionizací
EtOAc	ethylacetát
EtOH	ethanol
FDA	úřad pro kontrolu potravin a léčiv
GABA	kyselina $\gamma$ -aminomáselná
GC-MS	plynová chromatografie s hmotnostně spektrometrickou detekcí
GI <sub>50</sub>	koncentrace inhibující buněčný růst
HuAChE	lidská acetylcholinesterasa
HuBuChE	lidská butyrylcholinesterasa
IC <sub>50</sub>	inhibiční koncentrace
MIC	minimální inhibiční koncentrace
NMDA	N-methyl-D-aspartátový
NMR	nukleární magnetická rezonance
PAL	fenylalaninamoniaklyasa
PAMPA	test propustnosti přes paralelní umělé membrány
POP	prolyl oligopeptidasa
RNA	ribonukleová kyselina
ROS	reaktivní formy kyslíku
TLC	tenkovrstvá chromatografie
To	toluen
UV	ultrafialový

# ABSTRAKT

Univerzita Karlova v Praze, Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmaceutické botaniky a ekologie

Lucie Gábrlová

Diplomová práce: Alkaloidy čeledi Amaryllidaceae a jejich biologická aktivita

Cílem této diplomové práce bylo zpracování přidělené frakce alkaloidního extraktu získaného z *Chlidanthus fragrans* a izolace alespoň dvou alkaloidů za účelem testování jejich biologické aktivity.

K zpracování daného extraktu a izolaci alkaloidů v něm obsažených byla použita preparativní TLC. Získané látky byly následně podrobeny strukturní analýze, konkrétně zde byly použity metody EI-MS a NMR. Na základě získaných výsledků byly izolované látky identifikovány a připraveny pro měření jejich biologické aktivity, které už nebylo součástí této diplomové práce.

Izolované alkaloidy byly identifikovány jako 6 $\alpha$ -hydroxybufanidrin, krinamidin a krinin. 6 $\alpha$ -Hydroxybufanidrinu se nepodařilo získat dostatečné množství pro biologické testování. Inhibiční aktivita krinamidinu i krininu vůči erytrocytární AChE a sérové BuChE byla poměrně slabá. Stejně tak ani jeden z alkaloidů nevykazoval výraznější schopnost inhibovat POP, kde pro krinamidin byla stanovena  $IC_{50} = 0,790 \pm 0,062$  mM a pro krinin  $IC_{50} = 1,473 \pm 0,122$  mM. Měření cytotoxické aktivity bylo prozatím provedeno pouze u krininu. Vůči buněčné linii Caco -2 byla stanovena  $IC_{50} = 64,54 \pm 17,78$   $\mu$ M a vůči linii HT-29 byla naměřena  $IC_{50} = 50,84 \pm 1,42$   $\mu$ M. Vůči zdravému fibroblastu FHS-47int se ukázal krinin jako neaktivní.

**Klíčová slova:** Amaryllidaceae, *Chlidanthus fragrans*, AChE, BuChE, POP, cytotoxicita, 6 $\alpha$ -hydroxybufanidrin, krinamidin, krinin

# ABSTRACT

Charles University in Prague, Faculty of Pharmacy in Hradci Králové

Department of Pharmaceutical Botany and Ecology

Lucie Gábrlová

Diploma thesis: Alkaloids of family Amaryllidaceae and their biological activity

The aim of this diploma thesis was to compile assigned fraction of alkaloidal extract obtained from *Chlidanthus fragrans* and isolation of at least two alkaloids for testing their biological activity.

For the processing of the extract and isolation of the alkaloids contained in it was used preparative TLC. The obtained substances were then undergone structure analysis, specifically, there were used EI-MS and NMR methods. Based on the results obtained were isolated substances identified and prepared for screening of their biological activity, which was not part of this diploma thesis anymore.

The isolated alkaloids were identified as 6 $\alpha$ -hydroxybuphanidrine, crinamidine and crinine. 6 $\alpha$ -Hydroxybuphanidrine failed to get enough for biological testing. Inhibitory activity of crinamidine and crinine against erythrocyte AChE and serum BuChE was quite weak. Equally, neither of alkaloids showed stronger ability to inhibit the POP, where for crinamidine was determined  $IC_{50} = 0,790 \pm 0,062$  mM and for crinine  $IC_{50} = 1,473 \pm 0,122$  mM. The measurement of cytotoxic activity has been carried out only with crinine, so far. There was determined  $IC_{50} = 64,54 \pm 17,78$   $\mu$ M against the cell line Caco-2 and  $IC_{50} = 50,84 \pm 1,42$   $\mu$ M against cell line HT-29. Towards healthy fibroblast FHS-47int appeared as inactive.

**Key words:** Amaryllidaceae, *Chlidanthus fragrans*, AChE, BuChE, POP, cytotoxicity, 6 $\alpha$ -hydroxybuphanidrine, crinine, crinamidine